



IMPACTO DEL ESTADO CORPORAL Y NIVEL NUTRICIONAL DE HEMBRAS RUMIANTES EN GESTACIONES AVANZADAS SOBRE EL DESARROLLO REPRODUCTIVO DE LAS CRÍAS

Méd. Veterinario Ezequiel Emilio Boretto

Tesis

Para Obtener el Grado Académico de
Magíster en Reproducción Bovina

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados
Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC)

Córdoba, 2016



IMPACTO DEL ESTADO CORPORAL Y NIVEL NUTRICIONAL DE HEMBRAS RUMIANTES EN GESTACIONES AVANZADAS SOBRE EL DESARROLLO REPRODUCTIVO DE LAS CRÍAS

Méd. Veterinario Ezequiel Emilio Boretto

Comisión Asesora de Tesis

Director: Méd. Veterinario, MSc, PhD. María Belén Rabaglino

Co-director: Méd. Veterinario, MBA Dr. Humberto Tríbulo

Tribunal Examinador de Tesis

- | | |
|---|-------------------------|
| 1 | Dr. Marcelo H. Miragaya |
| 2 | Dra. Mariana Caccia |
| 3 | Dr. Gabriel Amilcar Bó |

Presentación formal académica

Noviembre de 2016

Instituto de Reproducción Animal Córdoba

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

"If you can't fly, then run, if you can't run, then walk, if you can't walk, then crawl, but whatever you do, you have to keep moving forward"

Martin Luther King Jr.

AGRADECIMIENTOS

Los trabajos realizados en el presente estudio de investigación tuvieron lugar en un sistema comercial de producción de leche y en las instalaciones de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC), provincia de Córdoba, Argentina. La financiación de los mismos fue provista por el proyecto PICT 2827/13 (FONCyT), fondos propios y la colaboración de los propietarios del establecimiento.

Mis agradecimientos están dirigidos hacia:

A la Dra. Belén Rabaglino, por su colaboración absoluta, soporte académico y enseñanza continua durante la realización de todo el estudio de investigación. A través de ella, transmito mis agradecimientos a su esposo, el Dr. Oscar Queiroz, quien fuera nuestro asesor nutricional en ambos modelos animales.

A toda mi familia, especialmente a mi esposa, mis padres y mi hermano, pilares fundamentales en mi vida y que sin su apoyo emocional, nada de esto hubiese sido posible.

A mi suegra, Diana, por su colaboración en el proceso final de diseño y formateo de presentaciones orales y escritas.

Al grupo de estudio de la UNRC y futuras colegas, Sofía Vitali, Virginia González Somenzini, María Florencia Pardo y Gabriela Vidal.

A Herve Luna y su familia, propietarios del Establecimiento "Don Emilio", por su colaboración y predisposición en todo momento.

Al laboratorio Zyvot y al Lic. Iván Anduaga, por proveernos del análisis de muestras para el dosaje de hormona anti-Mülleriana (AMH).

A la Lic. María Verónica Bonessi por abrirnos las puertas de su laboratorio de análisis clínicos.

A todos los que forman parte del IRAC, especialmente a todos los docentes que fueron parte de los dos años de estudio y que hacen del mismo, un excelente instituto de postgrado. También agradezco al staff administrativo, al cual he recurrido un número inmenso de veces y siempre me han brindado su atención y respeto para evacuar mis dudas.

Agradezco muy especialmente al Dr. Gabriel Bó por su enorme predisposición a ayudarme en todo momento y ser fuente permanente de motivación.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres, Alicia y Emilio, por ser mi ejemplo y modelo de vida y por todo el amor que me han dado durante toda su vida y que me han hecho el hombre que soy hoy en día.

También dedico esta tesis a mi hermano Martín, que además es mi amigo incondicional y una parte importante de los trabajos a campo se llevaron a cabo gracias a su colaboración.

Una dedicatoria muy especial y con todo mi amor es para mi esposa, Angie, compañera y amiga incondicional en todo este proceso, quien con su gran optimismo, amor, paciencia y compañía fue de las partes más importantes en la realización y culminación de este trabajo de investigación.

RESUMEN

Es frecuente que las vacas lecheras ganen excesiva condición corporal (CC) durante el secado, coincidiendo con el último periodo de la gestación. En cambio, las ovejas en condiciones extensivas, y debido al fotoperiodo, llegan al final de la gestación en épocas de escasa oferta forrajera. Tanto los excesos como las restricciones nutricionales en gestaciones avanzadas llevan a hipoglucemia fetal y menores niveles del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1). El IGF-1 es crítico para el desarrollo fetal de los órganos reproductivos. Por ende, las hijas podrían presentar alteraciones ováricas y uterínicas luego del nacimiento. El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de las variaciones nutricionales en gestaciones avanzadas de hembras rumiantes sobre los niveles plasmáticos de glucosa (GLU) e IGF1 de las crías neonatales y el grado de desarrollo ovárico/uterino en las corderas y función ovárica en las terneras alrededor de la pubertad. Para determinar el efecto de los excesos nutricionales, vacas de tambo estabuladas durante el último mes de gestación se separaron en dos grupos en función a la CC,: Control (“C”; $CC > 2.5$ y ≤ 3.75 , $n=5$) y Gordas (“G”; $CC \geq 4$, $n=5$). Para evaluar el efecto nutricional contrario, ovejas en el último tercio de la gestación fueron asignadas al grupo Control (“C”, $n=4$) o Restringido (“R”, $n=4$) y alimentadas al 100% o 50% de sus requerimientos energéticos, respectivamente. Se evaluaron niveles de GLU, IGF-1 y estradiol (E_2) de las hijas durante los primeros 30 días de vida en terneras y dos meses de vidas en corderas. Se determinaron niveles de hormona anti-Mülleriana (AMH) y diámetros foliculares alrededor del año de vida de las terneras, mientras que las corderas fueron eutanasiadas a los 2 meses de edad para evaluar la arquitectura histológica de ovarios y útero y la expresión génica para IGF-1 y sus receptores en dichos órganos. Los niveles de GLU e IGF-1 sanguínea fueron analizados como medidas repetidas en el tiempo en un modelo mixto, mientras que las diferencias para el resto de las determinaciones fueron analizadas por ANOVA. Comparado con las hijas de las madres en el grupo “C”, tanto las terneras nacidas de las vacas en el grupo “G”, como las corderas hijas de las ovejas en el grupo “R” tuvieron menores niveles de GLU e IGF-1 en los primeros días y semanas de vida, respectivamente, y de E_2 al mes (terneras) o dos meses (corderas) de edad ($p < 0,05$). Las terneras presentaron una tendencia a menores valores de AMH ($p=0,10$), lo que indicaría menor población folicular, y tendencia a menores diámetros foliculares ($p=0,10$) al año de vida; mientras que las corderas tuvieron menor expresión de IGF-1/IGF-1R a niveles ovárico y uterino ($p < 0,05$), menor peso del útero ($p < 0,05$), y menor número de glándulas uterinas y diámetros foliculares ($p < 0,05$) en los cortes histológicos. En conclusión, pudimos demostrar que tanto los excesos como las restricciones nutriciones en hembras rumiantes durante gestaciones avanzadas tienen efectos negativos en el desarrollo de los órganos reproductivos de las crías con posible impacto en el desempeño reproductivo futuro dentro de los establecimientos.

Palabras claves: Programación fetal, Nutrición, Glucosa, IGF-1, desarrollo reproductivo

ABSTRACT

Dairy cows frequently gain excessive body weight during the dry period. As this is coincident with the last stage of gestation, cows could reach parturition with a high body condition score (BCS). On the other hand, ewes in extensive conditions and due to the photoperiod undergo the last period of gestation on late winter, when forage supply is scarce. Maternal over and undernutrition during late gestation could lead to fetal hypoglycemia and lower levels of circulating insulin growth factor-1 (IGF-1). IGF-1 has a critical role in the development of fetal reproductive organs. Thus, the daughters might present ovarian and uterine alterations after birth. The main objective of this study was to evaluate the impact of maternal nutritional status during late gestation on blood levels of Glucose (GLU) and IGF-1 in neonatal offspring and the ovarian/uterine development of lambs and ovarian function of heifers near puberty. To determine the effect of overnutrition, dairy cows in the last month of gestation were separated in two groups according their BCS: Control ("C"; $BCS >2.5$ y ≤ 3.75 , n=5) and Fat ("F"; $BCS \geq 4$, n=5). To evaluate undernutrition, pregnant ewes in the last trimester were randomly assigned to Control ("C", N=4) or Restricted Group ("R", n=4) and fed a diet with the 100% or 50% of their energetic requirements, respectively. Levels of GLU, IGF-1 and estradiol (E_2) were evaluated during the first 30 days of age in calves and 60 days of age in lambs. Blood levels of anti-Müllerian hormone (AMH) and follicles diameter were evaluated in heifers at 12 months of age. Lambs were euthanized at 2 months of age to evaluate the histologic architecture of ovaries and uterus and gene expression of IGF-1 and its receptors on those organs. Blood levels of GLU and IGF-1 were analyzed as repeated measures in a mixed model, while the other results were analyzed through ANOVA. Compared with daughters born from cows or ewes in the "C" group, calves born from cows in the "F" group and lambs born from ewes in the "R" group had significantly lower levels of GLU and IGF-1 during the first days and weeks of life, respectively, and lower E_2 levels at one month of age (calves) or two months of age (lambs) ($p < 0.05$). Levels of AMH and follicles diameter tended to be lower ($p = 0.10$) in heifers at 12 months of age. Lambs at 2 months of age had lower levels of IGF-1/IGF-1R expression in ovaries and uterus, lower uterine weight and lower number of endometrial glands and smaller follicles ($p < 0.05$) in the histological analysis. Collectively, we concluded that maternal over or undernutrition has a negative impact on the development of their offspring's reproductive tract and therefore could have some long-term effects, probably impairing reproductive efficiency in adult life.

Keywords: *Fetal Programming, Nutrition, Glucose, IGF-1, reproductive development*

TABLA DE CONTENIDO

Índice.....	Página
Capítulo 1: REVISION BIBLIOGRAFICA.....	1
1.1. Nutrición materna y programación fetal.....	1
1.2. Nutrición materna y desarrollo fetal.....	4
1.3. Sistema regulador de la homeostasis energética fetal e IGFs.....	7
1.4. Desarrollo reproductivo en las hembras.....	9
1.4.1. IGFs y desarrollo reproductivo en la hembra.....	10
1.4.2. Hormona anti-Mülleriana y fertilidad de las hembras.....	12
1.5. Hipótesis.....	13
1.6. Objetivos.....	14
1.6.1. Objetivo General.....	14
1.6.2. Objetivos Específicos.....	14
Capítulo 2: MODELO BOVINO.....	16
2.1. Introducción.....	16
2.2. Materiales y Métodos.....	17
2.2.1. Animales.....	18
2.2.2. Toma de muestras.....	18
2.2.3. Medición de metabolitos sanguíneos.....	19
2.2.4. Función ovárica.....	20
2.2.5. Análisis Estadístico.....	20
2.3. Resultados.....	20
2.3.1. Concentraciones sanguíneas de GLU e IGF-1 en vacas.....	21
2.3.2. Concentraciones sanguíneas de E₂ en vacas.....	22

2.3.3. Concentraciones sanguíneas de GLU en terneras.....	23
2.3.4. Concentraciones sanguíneas de IGF-1 en terneras.....	24
2.3.5. Concentraciones sanguíneas de E ₂ en terneras.....	25
2.3.6. Concentraciones sanguíneas de AMH en terneras Holstein de alrededor de 12 meses de edad.....	26
2.3.7. Evaluación folicular en terneras Holstein de alrededor de 12 meses de edad.....	27
2.4. Discusión.....	28
2.4.1. Niveles sanguíneos de GLU, IGF-1 y E ₂ maternos.....	29
2.4.2. Niveles sanguíneos de GLU e IGF-1 en las crías.....	31
2.4.3. Niveles sanguíneos de E ₂ en las crías.....	33
2.4.4. Niveles sanguíneos de AMH y diámetro folicular en las crías.....	35
2.5. Conclusión.....	39
Capítulo 3: MODELO OVINO.....	40
3.1. Introducción.....	40
3.2. Materiales y Métodos.....	42
3.2.1. Animales.....	42
3.2.2. Toma de muestras.....	43
3.2.3. Medición de metabolitos sanguíneos.....	44
3.2.4. Histología.....	44
3.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR).....	45
3.2.6. Análisis estadístico.....	46
3.3. Resultados.....	47
3.3.1. Concentraciones sanguíneas de GLU en ovejas.....	47
3.3.2. Concentraciones sanguíneas de IGF-1 en ovejas.....	48
3.3.3. Concentraciones sanguíneas de E ₂ en ovejas.....	48
3.3.4. Concentraciones sanguíneas de GLU en corderas.....	49
3.3.5. Concentraciones sanguíneas de IGF-1 en corderas.....	50

3.3.6. Concentraciones sanguíneas de E ₂ en corderas.....	52
3.3.7. Expresión de ARNm para IGF-1 y su receptor (IGF-1R) a los 60 días de vida.....	53
3.3.8. Peso de los órganos reproductivos a los 60 días de vida.....	54
3.3.9. Histología ovárica.....	55
3.3.10. Histología uterina.....	57
3.4. Discusión.....	58
3.4.1. Glucosa.....	59
3.4.2. IGF-1 e IGF-1R.....	60
3.4.3. E ₂ y sus receptores (ESR1 y ESR2)	63
3.4.4. Histologías ováricas y uterinas.....	65
3.5. Conclusión.....	67
Capítulo 4: CONCLUSIONES GENERALES	69
Capítulo 5: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

LISTA DE TABLAS

TABLA.....	Página
3.1. Número de acceso y secuencias de los cebadores utilizados para qRT-PCR.....	46
3.2. Peso promedio (gramos) de los órganos reproductivos en corderas nacidas de madres restringidas nutricionalmente al final de la gestación o controles.....	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA.....	Página
2.1. Niveles promedio de glucosa sanguínea en vacas Holstein durante el período de secado con condiciones corporales < 4 (Grupo Control o "C") o ≥ 4 (Grupo Gordas o "G")	21
2.2. Niveles sanguíneos de estradiol en vacas Holstein durante el período de secado con condiciones corporales < 4 (Grupo Control o "C") o ≥ 4 (Grupo Gordas o "G").....	23
2.3. Niveles promedio de glucosa sanguínea en terneras Holstein durante el primer mes de vida nacidas de madres con condiciones corporales < 4 (Grupo Control o "Ch") o ≥ 4 (Grupo Gordas o "Gh") durante el período de secado.....	24
2.4. Niveles promedio de IGF-1 sanguíneos en terneras Holstein durante el primer mes de vida nacidas de madres con condiciones corporales < 4 (Grupo Control o "Ch") o ≥ 4 (Grupo Gordas o "Gh") durante el período de secado.....	25
2.5. Niveles sanguíneos promedio de estradiol en terneras Holstein durante el primer mes de vida nacidas de madres con condiciones corporales < 4 (Grupo Control o "Ch") o ≥ 4 (Grupo Gordas o "Gh") durante el período de secado.....	26
2.6. Niveles sanguíneos promedio de hormona anti-mülleriana (AMH) en terneras Holstein alrededor de los 12 meses de vida nacidas de madres con condiciones corporales < 4 (Grupo Control o "Ch") o ≥ 4 (Grupo Gordas o "Gh") durante el período de secado.....	27
2.7. Diámetros de folículos ováricos de terneras de alrededor de 12 meses de edad nacidas de madres con condiciones corporales < 4 (Grupo Control o "Ch") o ≥ 4 (Grupo Gordas o "Gh") durante el período de secado.....	28
3.1. Niveles promedio de glucosa sanguínea en ovejas preñadas alimentadas al 100% (Controles o "C") o al 50% (Restringidas o "R") de los requerimientos durante el último mes de gestación.....	48
3.2. Concentraciones sanguíneas de estradiol durante la semana previa al parto de ovejas alimentadas al 100% (Controles o "C") o al 50% (Restringidas o "R") de los requerimientos durante el último tercio de la gestación.....	49
3.3. Niveles promedio de glucosa sanguínea en corderas nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el 3/3 de gestación (Restringidas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C").....	50

3.4. Niveles promedio de IGF-1 sanguíneos en corderas nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el 3/3 de gestación (Restringidas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C").....	51
3.5. Concentraciones sanguíneas de estradiol obtenidas a los 50 días de vida de corderas nacidas de madres alimentadas al 100% (Controles o "C") o al 50% (Restringidas o "R") durante el último tercio de gestación.....	52
3.6. Expresión génica en el útero para el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IFG1), receptor uterino del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R), receptor uterino para Estradiol 1 (ESR1) y 2 (ESR2) en corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el 3/3 de gestación (Restringidas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C").....	53
3.7. Expresión génica en el ovario para el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IFG1), receptor ovárico del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R), receptor ovárico para Estradiol 1 (ESR1) y 2 (ESR2) en corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el 3/3 de gestación (Restringidas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C").....	54
3.8. A. Diámetros promedios de folículos (secundarios y terciarios) ováricos en corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el 3/3 de gestación (Restringidas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C").....	56
B. Imágenes de cortes histológicos de ovario captadas por el Software Fiji a un aumento de 4X de corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el 3/3 de gestación (Restringidas) o alimentadas al 100% (Controles).....	56
3.9. A. Número promedio de glándulas endometriales en corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el 3/3 de gestación (Restringidas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C").....	57
B. Imágenes de cortes histológicos de úteros captadas por el Software PhotoImpact a un aumento de 40X de corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el 3/3 de gestación (Restringidas) o alimentadas al 100% (Controles).....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN.....	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
AGNE.....	ácidos grasos no esterificados
AGRP.....	proteína relacionada al color agutí
AMH.....	hormona anti-mülleriana
ARC.....	núcleo arcuato (hipotalámico)
ARN.....	ácido ribonucleico
ARNm.....	ácido ribonucleico mensajero
BAX.....	gen pro-apoptótico
BCL2.....	gen pro-apoptótico
BE.....	benzoato de estradiol
BEN.....	balance energético negativo
CASP3.....	gen para Caspasas
CC.....	condición corporal
CCC.....	clasificación de condición corporal
CL.....	cuerpo lúteo
DE.....	desviación estándar
dl.....	decilitros
E ₂	estradiol 17-β
EM	energía metabólica
ESR1.....	receptor 1 para estradiol
ESR2.....	receptor 2 para estradiol
FoXO3a.....	gen pro-apoptótico
FSH.....	hormona folículo estimulante
GDF9.....	factor de crecimiento 9
GH.....	hormona de crecimiento
GLU.....	glucosa
HHG.....	hipotálamo-hipófisis-gonada
IA.....	inseminación artificial
IGF-1.....	factor de crecimiento insulínico tipo 1
IGF-2.....	factor de crecimiento insulínico tipo 2
INS.....	insulina
ITM2B.....	gen pro-apoptótico
LH.....	hormona luteinizante
ME.....	Mediana
mg.....	miligramos
ml.....	mililitros
mm.....	milímetros
ng.....	nanogramos
NPY.....	neuropéptido Y
NRC.....	national research council
P450arom.....	enzima aromatasa P450
PFA.....	población folicular antral
pg.....	picogramos

POMC.....	proopiomelanocortina
PVN.....	núcleo paraventricular (hipotalámico)
qRT-PCR.....	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RFO.....	reserva folicular ovárica
RIA.....	radioinmunoanálisis
TMR.....	dietas totalmente mezcladas
UNRC.....	Universidad Nacional de Río Cuarto

CAPITULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Nutrición materna y programación fetal

En cualquier sistema productivo en el que se aspire a ser sustentable y perdurable en el tiempo, se deben lograr ciertos objetivos productivos. Los objetivos de los sistemas de producción ganadera involucran parámetros productivos, reproductivos, de manejo y sanitarios. Entre los primeros, y siendo el más importante y de mayor impacto, se encuentra la nutrición. En Argentina, la producción bovina de leche y ovina están predispuestas a enfrentar situaciones nutricionales opuestas: el exceso o la falta de alimentos.

En tambos bovinos se ha avanzado mucho en la formulación y ajustes de dietas, ya que actualmente los sistemas estabulados son cada vez más frecuentes. Sin embargo, este sistema predispone a que los animales presenten excesos nutricionales y de gordura, principalmente en el período de vaca seca, que coincide con el final de la gestación (De la Sota, 2006; Holtenius y col., 2007).

Por otro lado, la producción ovina se desarrolla mayormente en las zonas patagónicas del país. Debido a inclemencias climáticas en el invierno sumado a las condiciones fisiológicas del fotoperíodo negativo de los ovinos, los animales pueden encontrarse bajo condiciones de subnutrición y/o restricciones alimenticias durante la preñez, especialmente al final de la misma (La Torraca, 2015).

Mientras la nutrición durante la preñez tiene un rol esencial en el desarrollo fetal y de la placenta, poco se sabe del impacto que tiene la nutrición materna durante la gestación

sobre el estado de salud y de productividad de la cría al nacimiento, pubertad y vida adulta. Además de éstos, aspectos como la severidad y duración de la adversidad materna y el momento o tercio de gestación en la que sucede o sucedió, deben ser considerados (Robinson y col., 1999).

David Barker y col. (1993) fueron los primeros en definir el término de "programación fetal" explicando que aquellas adversidades maternas (tales como desbalances nutricionales, consumo de sustancias nocivas, situaciones estresantes, etc) durante momentos críticos del desarrollo fetal tendrían efectos a largo plazo en la descendencia. Mediante estudios epidemiológicos de cohorte (retrospectivos), en Gran Bretaña y Europa, los autores relacionaron en humanos, las deficiencias nutricionales durante la primera mitad de la gestación de las madres con hijos que fueron más delgados al nacimiento, pero que en su vida adulta tuvieron una mayor incidencia de problemas de salud, entre ellos, obesidad, diabetes y problemas cardiovasculares (Godfrey y Barker, 2000).

Si bien esta definición fue realizada en base a estudios observacionales sobre humanos, su significado biológico es totalmente aplicable a otras especies animales. Por tal motivo, la teoría del "Origen fetal de las enfermedades de los adultos", como el Dr. Barker la definiera, es, desde hace más de dos décadas, puesta a prueba a niveles experimentales en distintos tipos de animales. Entre ellos se pueden encontrar en la literatura trabajos realizados en ratas, ratones, ovinos y bovinos.

Entre la especie humana y bovina hay varias similitudes en términos reproductivos: períodos de gestación muy similares (alrededor de 9 meses, o 280 días), ambas especies tienen ovulaciones simples con ciclos estrales continuos y múltiples ondas de crecimiento folicular con crecimiento y atresia de folículos antrales en cada ciclo reproductivo, etc. (Evans, 2003).

El motivo por el cual situaciones adversas durante la vida fetal pueden darse de manifiesto en la vida adulta del individuo se basa en las modificaciones que pueden producirse a nivel de la estructura del ADN y que repercuten permanentemente en la expresión génica, lo cual se conoce como modificaciones epigenéticas. La cromatina está formada por una doble hélice de ADN y por histonas. Estas últimas hacen las veces de bobinas en las que la larga cadena de ADN se enrolla (dos veces en cada una de ellas), dando la apariencia característica de un collar de perlas (las perlas representan al ADN más las histonas, unidad estructural conocida como nucleosomas).

Aquí es donde la epigenética tiene lugar ya que, para que el ADN interactúe directamente con las enzimas que intervienen en su replicación y regulación debe haber una remodelación de la cromatina. Si por alguna razón se producen modificaciones en las histonas como la metilación (alteraciones epigenéticas mejores estudiadas hasta la fecha), la región de ADN relacionada a esas histonas no puede desenrollarse para permitir la transcripción del ARNm, por lo que no habría una buena expresión de los genes que forman parte de la cadena de ADN en ese segmento, haciendo que los genes se silencien o "apaguen" (gen OFF). Las deficiencias nutricionales son un buen ejemplo de estos cambios, ya que la producción de donantes de grupos metilos para la metilación del ADN es un proceso complejo que depende de factores dietarios esenciales (Chango, 2015). Otro cambio epigenético es el que se observa cuando se produce el fenómeno de acetilación en las histonas, las cuales "prenden" al gen (gen ON) promoviendo su expresión (Reik y col., 2001).

La gestación y organogénesis en los mamíferos son momentos muy susceptibles, especialmente, luego de la fertilización en la que los genomas maternos y paternos son demetilados extensivamente para volver a metilarse (metilación de novo) en posteriores etapas (Reik y col., 2001; Novakovic, 2011). En recientes investigaciones, se ha observado que restricciones nutricionales pueden acarrear deficiencias de grupos metilos necesarios

para la metilación de novo (Chango, 2015) Esto podría originar alteraciones en el patrón epigenético del nuevo individuo produciendo, entre otras cosas, modificaciones permanentes en el fenotipo (Gardner, 2009).

1.2. Nutrición materna y desarrollo fetal

El desarrollo intrauterino es esencial para el éxito de la preñez y la sobrevivencia de las especies, ya que interviene en el crecimiento, desarrollo y composición corporal, afectando las tasas posnatales de mortalidad, como así también los parámetros relacionados con la salud y productividad de las crías durante su vida adulta (Spiegler y col., 2014).

La placenta representa un órgano crítico en el desarrollo fetal y en el mantenimiento de la preñez hasta su término. Su importancia fundamental radica en ser, por un lado, la fuente de soporte nutricional y endócrino para el embrión y feto, y además, el medio por el cual se eliminan los desechos orgánicos producidos por estos mediante su paso a la circulación materna (Bell y col., 1999). Su crecimiento es máximo entre los días 30 y 80 en la oveja y 60 y 120 en la vaca (Funston y col. 2010; Ehrhardt y Bell, 1995). La placenta de los rumiantes es de tipo cotiledonaria con distintas áreas de unión materno-fetal que corresponden a los placentomas (Igwebuike, 2009). Estos se encuentran formados por cotiledones fetales (corioalantoides) y las carúnculas endometriales maternas (no glandulares); mientras que las áreas intercarunculares son altamente glandulares (Gray y col., 2001).

A pesar de las diferentes longitudes de gestación entre ambas especies el crecimiento máximo de la placenta ocurre entre el primer y segundo tercio de la gestación (Funston y col. 2010), mientras que el mayor crecimiento fetal ocurre al final de la gestación (Reynolds y Redmer, 1995). Cualquier evento adverso durante estos períodos

puede originar alteraciones en el desarrollo fetal. En un experimento realizado en vacas multíparas jóvenes bajo condiciones de subnutrición durante los días 30 a 120 de gestación, se pudo observar una disminución en el peso del tejido cotiledonario y en la superficie total de placentomas, que llevó a una disminución en el crecimiento fetal hacia el día 125 de gestación (Long y col., 2009). Los autores concluyeron que a pesar del crecimiento fetal compensatorio observado después de la “realimentación”, que llevó a que los pesos de las placentas y crías al nacimiento sean muy similares entre grupos, hubo alteraciones postnatales en el metabolismo de la glucosa (GLU) y contenido graso en las crías pertenecientes al grupo subnutrido (Long y col., 2009, 2010, 2012; Funston y col., 2010). Similares resultados se obtuvieron en ovejas subnutridas (al 50% de los requerimientos) desde los 110 días de gestación hasta el parto (último tercio de gestación), observándose similares pesos de las placentas y pesos vivos de las crías al nacimiento entre grupos, sumado a una profunda alteración en el metabolismo, con una marcada falta de regulación en la secreción de insulina (INS) (Gardner y col., 2005). En humanos, una restricción nutricional en el último tercio de la gestación también coincide con el período de máximo crecimiento fetal y, al igual que en los trabajos anteriores realizados en pequeños rumiantes, se observó una alteración en la homeostasis de la GLU e INS (Plagemann, 2006).

Otros estudios demostraron que el número de placentomas puede verse limitado por una restricción nutricional durante el primer tercio de gestación en ovejas (Wathes y col., 1998). Mientras que si la restricción se produce en el último tercio, se afecta el tamaño y la morfología de los placentomas en lugar de su número (Vatnick y col., 1991; Wallace y col., 1996), lo que de cualquier manera traería consecuencias negativas considerando el momento de máximo crecimiento de los fetos.

Asimismo, una intensa lipo-movilización materna durante el tercer tercio de la gestación, producto de la mayor demanda fetal más un cuadro de subnutrición materna, puede disminuir el desempeño reproductivo de las crías, tal como se vio en vaquillonas con retardos en la primera ovulación (Guedon y col., 1999).

Las concentraciones de hormonas esteroideas también pueden verse afectadas por el nivel de ingesta materna, tal como se documenta en el estudio realizado por Mossa y col. (2013), en donde se restringió nutricionalmente a vacas preñadas en el primer tercio de la gestación, reportándose menores niveles circulantes de estradiol y mayores niveles de testosterona hacia el final de la gestación, comparado con el perfil endocrinológico de las vacas controles.

En un estudio reciente realizados en ovejas, se encontró que tanto la restricción nutricional como los excesos nutricionales durante la preñez temprana alteraron el perfil de producción de esteroides hacia el final de la gestación (Lemley y col., 2014). Se han reportado distintos efectos de elevados niveles nutricionales durante la gestación, involucrando desde falta de desarrollo fetal (Wallace y col., 2000, 2001) hasta disminución en el número de folículos ováricos (Da Silva y col., 2002), producto de retardos en el desarrollo placentario con el consecuente aumento de las tasas de mortalidad fetal y neonatal en ovejas (Wallace y col., 2003). Esta situación se debe a que la mayor ingesta de alimento estimula un mayor efecto anabólico hacia los tejidos maternos, llevando a desbalance metabólico, con excesivos niveles de GLU, INS e IGF-1 maternos, pero con una disminución en la transferencia de nutrientes hacia el útero grávido (Da Silva y col., 2002). En concordancia, Wallace y col. (2000), reportaron que las concentraciones de GLU, INS y de IGF-1 estaban significativamente disminuidas en fetos con crecimiento restringido producto de una excesiva nutrición durante el tercer tercio de la gestación. Por otra parte, se pudo observar que durante la primera mitad de la gestación los niveles elevados de nutrición tuvieron poco impacto en el peso de las crías al nacimiento. Sin embargo su efecto fue positivamente relacionado hacia el último tercio de la preñez con diferencias de peso al nacimiento entre los grupos (Gardner y col., 2007).

En un interesante estudio, Da Silva y col. (2002) concluyeron que una nutrición en exceso en ovejas durante primer tercio de gestación fue asociada positivamente con un

retardo el desarrollo placentario (entre 35-48% menor en el área total de placentomas versus el grupo control) y con una posterior disminución de tamaño en órganos fetales, tales como hígado, cerebro y ovarios, hacia el día 131 de gestación, cuando las preñeces fueron interrumpidas. Todo lo anterior impactó en el peso de los fetos con claras diferencias entre los grupos.

En conclusión, el estatus nutricional materno durante la preñez es un importante factor ambiental intrauterino que impacta sobre el desarrollo placentario y el crecimiento fetal. El sistema regulador de la homeostasis energética en el feto y su relación con la familia de los factores de crecimiento tipo insulínicos es el principal mecanismo involucrado en dichos sucesos.

1.3. Sistema regulador de la homeostasis energética fetal e IGFs

El sistema encargado de regular el balance energético (o niveles de GLU sanguínea) se encuentra compuesto por una parte neural y otra endócrina, las cuales interaccionan permanentemente. La primera de ellas, la neural, se ubica en el cerebro y las neuronas encargadas de expresar las señales de apetito (a través de neuropéptidos orexigénicos) o saciedad (a través de neuropéptidos anorexigénicos) se hallan en el núcleo arcuato (ARC) del hipotálamo, conocido como "el centro de la alimentación" (Kalra y col., 1999). Desde aquí se emiten las señales hacia el núcleo hipotalámico paraventricular (PVN) para realizar los ajustes necesarios sobre el balance energético (Saper y col, 2002). Los neuropéptidos orexigénicos son el neuropéptido Y (NPY), el más potente, y la proteína relacionada al agutí (AGRP, por sus sílabas en inglés). El neuropéptido anorexigénico más importante es la pro-opiomelanocortina (POMC) (Broberger, 2005; Woods y col., 1998).

En especies precoces, como el ser humano, ovejas y bovinos, la red neuroendócrina del apetito se desarrolla durante la vida fetal, por lo que es totalmente competente hacia el

último tercio de la gestación (Muhlhausler y col., 2006, 2004). En un estudio realizado por Muhlhausler y col. (2005) en ovejas en el último tercio de gestación, se demostró la respuesta del hipotálamo de los fetos a través de infusión de GLU intrafetal, observando una elevación en las concentraciones de POMC.

Las dos hormonas más importantes involucradas en la regulación endócrina de este sistema son la INS y la leptina. Esta última es una hormona secretada por los adipocitos blancos como una señal de acumulación grasa (Halaas y col, 1995), mientras que la INS es secretada por las células beta del páncreas y tiene como función esencial controlar el metabolismo de los carbohidratos y las grasas, siendo la principal hormona reguladora de la disposición de nutrientes (Schwartz y col, 1992). Ambas hormonas informan a nivel central (hipotalámico) sobre adecuados niveles de GLU estimulando la saciedad. Por ende, entre sus funciones están la de inhibir la acción del NPY y AGRP (que producen sensación de hambre) y estimular la expresión del POMC (Broberger, 2005).

La GLU es el principal nutriente para el feto en crecimiento (Battaglia y Meschia 1978) y sus concentraciones pueden fluctuar en función a la nutrición materna haciendo variar al resto de las hormonas. Además, los factores de crecimiento tipo insulínicos 1 (IGF-1) y más importante, y 2 (IGF-2) dependen de las concentraciones de GLU para su síntesis y liberación al torrente sanguíneo (Oliver y col.,1993). Estos autores observaron que fetos hipoglucémicos también presentan niveles de INS e IGF-1 menores y que ante una infusión intrafetal de GLU, la Glucemia se eleva rápidamente, acompañada por un incremento de la INS e IGF-1 (Oliver y col.,1993; Wallace y col., 2000). Las principales funciones de los IGF son la de estimular la proliferación y diferenciación celular a través de mecanismos autócrinos y/o parácrinos en diversos órganos, entre los cuales están, el cerebro, ovarios y útero (Nayak y Giudice, 2003). Por ende, la compleja red neuro-endócrina no solo está envuelta directamente en la regulación de los niveles energéticos del animal, sino también indirectamente en el desarrollo y funcionamiento del sistema reproductor.

1.4. Desarrollo reproductivo en las hembras

La organogénesis en el embrión comienza en etapas muy tempranas de la gestación. Las células germinales que darán lugar tanto a las gónadas masculinas como femeninas, comparten el mismo origen embriológico migrando desde el saco vitelino hacia la cresta gonadal en desarrollo entre los días 18 y 31 de vida embrionaria (Wrobel y Suss, 1998). Luego las gónadas primordiales comienzan la diferenciación hacia ovarios o testículos, comandadas por distintos genes y dirigidos hacia la ovogénesis en la hembra o espermatogénesis en el macho. En los testículos fetales, las células germinales alcanzan un estado mitótico de quiescencia y se mantienen así hasta la pubertad. En la hembra, en cambio, la presencia de células germinales en división meiótica son el primer indicador del comienzo de la ovogénesis en el ovario fetal (Spiller y col. 2012). El pool de folículos ováricos se completa hacia el día 75 oveja (McNatty y col., 1995) y entre los días 90 y 140 de gestación de la vaca (Erickson 1966b; Russe, 1983; Tanaka y col., 2001; Yang y Fortune, 2008), alcanzando un número de 2,1 millones de folículos primordiales (Smitz y Cortvrindt, 2002; Aerts y Bols, 2010). En ambas especies, esta cifra va disminuyendo con el transcurso de la gestación mediante dos sucesos: 1) la selección y activación de folículos primordiales a primarios (alrededor del día 90 y 140 en oveja y vaca, respectivamente) y de éstos a secundarios y antrales pequeños (120 días de gestación en la oveja y 210 días en la vaca) (McNatty y col. 1995, 2000; Yang y Fortune, 2008) y 2) apoptosis, que representa la muerte celular programada y cuya máxima expresión se da hacia la mitad de la gestación (Erickson 1966b; Aerts y Bols, 2010; McNatty y col. 1995, 2000).

Al nacimiento queda programada la población total de folículos, conocida como reserva folicular ovárica (RFO), y que ronda en 130.000 folículos primordiales. Esta cifra es de muy alta variabilidad entre individuos (Erickson 1966b; Aerts y Bols, 2010). La magnitud de la RFO determina la tasa de folículos entrantes dentro del pool de crecimiento, el número de folículos en crecimiento (población folicular antral o PFA), y últimamente, la longevidad reproductiva y respuesta superovulatoria (Ireland y col., 2011).

Cuando esos folículos pre-antrales se desarrollan a antrales, se llenan de líquido (rico en hormonas y factores de crecimiento) y sus diámetros irán aumentando hasta la ovulación o la atresia. Estos folículos antrales se desarrollan en cohortes, grupos u ondas de crecimiento (Ireland y col., 2000; Evans, 2003) y están íntimamente relacionados con el tamaño de la RFO, es decir que mientras mayor sea la RFO, mayor será el número de folículos que integrará cada onda de crecimiento (Evans y col. 2012). A estos folículos en crecimiento se los conoce como población folicular antral (PFA) y pueden ser utilizadas como un estimador de la RFO.

El desarrollo uterino de las especies domésticas y la mujer tiene lugar durante la vida gestacional, desde etapas muy tempranas de la embriogénesis hasta el parto (Wiley y col., 1987). Hacia el día 90 de gestación aparecen los primeros nódulos aglandulares a nivel endometrial, que más tarde serán las carúnculas endometriales y que al unirse con los cotiledones fetales formarán los placentomas. Estos son los encargados del intercambio gaseoso y micronutrientes entre madre y feto (Wiley y col., 1987). Entre ovinos y bovinos, específicamente, hay ciertas similitudes. En ambas especies, por ejemplo, el desarrollo glandular uterino comienza el último mes de gestación, como invaginaciones epiteliales planas que continuarán su desarrollo y crecimiento durante su vida postnatal. El mayor crecimiento glandular se completaría en cercanías de la pubertad (Wiley y col., 1987). Las corderas hacia los 56 días de posparto tienen sus úteros histológica y estructuralmente muy similares a los de los adultos, mientras en las terneras hay un gran crecimiento glandular entre el nacimiento y los 3 meses de vida (Wiley y col., 1987).

1.4.1. IGFs y desarrollo reproductivo en la hembra

Los factores de crecimiento insulínicos (IGF, tipo 1 y 2) y sus receptores y proteínas de unión pueden encontrarse en una amplia variedad de tejidos corporales para el control de procesos anabólicos y catabólicos, en respuesta a cambios en los niveles de

alimentación (Mognet y Martin, 1997). Los IGF también están presentes a nivel central, hipófisis, en tejido ovárico y uterino. Es por esta razón que se cree que sus mecanismos de acción no solo son endócrinos, sino también autócrino y paracrino, probablemente a cada nivel del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (HHG) (Nayak y Giudice, 2003; Mognet y Martin, 1997).

Los IGF-1 y 2 son proteínas sensibles a los niveles de ingesta materna y modulan el crecimiento placentario y fetal (Baker y col., 1993; Liu y col., 1993), ya que participan en la partición y transferencia de nutrientes entre sangre materna y fetal (Liu y col., 1993) y regulan la captación de nutrientes en la placenta y tejidos fetales (Igwebuike, 2010).

El IGF-1 ha sido positivamente relacionado con el número de placentomas (Osgerby y col., 2002), la longitud y tamaño fetal en casos de deficiencia nutricional (con una concentración plasmática 30% menor) o exceso nutricional (con un aumento del 22%) materna en ovejas (Dong y col., 2008). El IGF-1 tiene gran influencia desde etapas tempranas de la embriogénesis, mientras que el IGF-2 aumenta su concentración hacia el segundo tercio de la gestación hasta el parto (Gallaher y col., 1995; Owens y col., 1994). La placenta de los rumiantes es la fuente de IGF-2 fetal y el medio por el cual se produce el clivaje de IGF-1 desde la circulación fetal (Bassett y col., 1990; Holland y col., 1997).

El IGF-1 es el más estudiado por su acción reproductiva. El IGF-1 parece tener múltiples roles en la regulación folicular, actuando sinérgicamente con la FSH (hormona folículo estimulante de liberación hipofisiaria) como regulador autócrino de la proliferación de células de la granulosa y en la inducción de actividad esteroidogénica de las células del cumulus oophorus (Mognet y Martin, 1997); y en ausencia de FSH, como un regulador parácrino en la proliferación de las células del cúmulo en pequeños folículos antrales (Armstrong y col., 1996). El crecimiento folicular, en los rumiantes y humanos, puede ser dividido en 2 etapas. La primera de ellas involucra folículos de hasta 2mm en la oveja y 5mm en la vaca (y en la mujer) de diámetro, y es independiente de las

concentraciones de gonadotrofinas hipofisiarias (FSH y LH). Más allá de estos tamaños, y durante toda la segunda etapa, el crecimiento folicular y la ovulación están estrictamente comandados por las hormonas hipotálamo-hipofisiarias (Mognet y Martin, 1997). Es por esto que se cree que el rol del IGF-1 durante las etapas foliculares tempranas será de mayor importancia, mientras que durante las fases más tardías tendría un efecto “permisivo” a la acción de las gonadotrofinas (Mognet y Martin, 1997; Armstrong y col., 1996).

Los IGF-1 y sus receptores cumplen importantes funciones en la foliculogénesis en los animales recién nacidos hasta la pubertad y en sinergismo con los niveles de estradiol 17β (E_2) promueven el desarrollo uterino glandular en ovinos y bovinos hasta la pubertad (Taylor y col., 2001). Mediante ecografías seriadas en terneras desde el postparto temprano hasta su etapa de vaquillonas prepúberes se determinó la estrecha relación existente entre el desarrollo folicular ovárico y el desarrollo del útero (vagina y vulva) hasta la pubertad (Honaramooz y col., 2004). Posiblemente se deba a que el E_2 producido por los folículos aumenta los niveles de expresión génica del receptor de IGF-1 (IGF-1R) a nivel uterino estimulando la captación del IGF-1 y sus funciones mitóticas y de diferenciación celular, como así también, aumentar los niveles de expresión génica para receptores de E_2 , ESR1 y ESR2 a nivel ovárico y uterino (Carpenter y col., 2003; Taylor y col., 2001). En ratas se comprobó que ante la ausencia total del IGF-1R los úteros de las crías manifiestan gran falta de desarrollo y crecimiento (Baker y col., 1996).

Como fuera mencionado anteriormente, la súper familia de IGFs es de producción hepática y sus concentraciones varían en función a niveles de ingesta, GLU en sangre e INS (Wallace y col. 2000; Oliver y col. 1993). Por lo que el impacto de los niveles de ingesta materna tendrán diferentes efectos en el desarrollo fetal en función a la severidad, duración y momento o período gestacional en el que ocurran (Robinson y col., 1999).

1.4.2. Hormona anti-Mülleriana y fertilidad de las hembras

La AMH se halla presente en el ovario fetal y adulto y es producida por las células de la granulosa de folículos pre-antrales y antrales tempranos (Ribeiro y col., 2014). En vacas, se han realizados extensos estudios que demuestran una fuerte relación lineal entre la AMH y la PFA (Ireland y col., 2010). En el mismo estudio, los autores observaron que las concentraciones de la hormona durante todo el ciclo estral fueron relativamente estáticas, por lo que se podrían predecir la PFA y respuesta superovulatoria en cualquier momento del ciclo con un simple análisis de laboratorio (Ireland y col., 2010).

Recientemente se ha observado que la nutrición materna puede tener consecuencias negativas en los niveles sanguíneos de AMH, e incluso de sus crías, cuando se aplican restricciones nutricionales (del 40% de la energía de mantenimiento) durante el primer tercio de la gestación (Mossa y col., 2012). Similares resultados se obtuvieron en corderas (retraso en el desarrollo folicular) hijas de ovejas que habían sufrido restricción nutricional durante el primer tercio de la gestación (Borwick y col., 1997; Rae y col., 2001; Grazul-Bilska y col., 2009). Esta situación puede observarse en algunos países, como Nueva Zelanda y Argentina, que por motivos de manejo se restringe la oferta forrajera durante la primera mitad de la gestación de ovejas y vacas de carne, para asegurar una buena cantidad de pasturas en etapas más próximas al parto (coincidentes con el mayor crecimiento fetal) y en el postparto, para asegurar una buena producción de leche para las crías (Kenyon, 2008).

En general, cada vez más evidencia hasta la fecha ha demostrado que los niveles plasmáticos de AMH tienen una elevada correlación con la PFA, y que parece ser un interesante marcador endócrino para identificar y seleccionar las mejores donantes de ovocitos en protocolos de superovulación para la producción de embriones in vitro, independientemente del genotipo y edad de la hembra (Baruselli y col., 2015; Rico y col., 2009).

1.5. Hipótesis

Los establecimientos bovinos de producción de leche en la Argentina se ven bajo condiciones de manejo cada vez mas intensivas siendo cada vez más frecuente la presencia de animales con excesivas CC en diferentes etapas del ciclo de producción y de la gestación (De la Sota, 2006). La situación de la ganadería ovina es diferente, donde la región patagónica del país concentra más del 60% del stock nacional en condiciones total o parcialmente extensivas (La Torraca, 2015). La condición de fotoperíodo negativo de esta especie predispone a que una parte importante de la gestación se desarrolle en épocas de escasas de oferta nutricional (La Torraca, 2015).

La hipótesis de esta tesis es que tanto los excesos como las restricciones nutricionales en gestaciones avanzadas en vacas lecheras u ovejas, respectivamente, alterarán los niveles de GLU e IGF-1 durante la vida fetal, afectando el desarrollo ovárico y uterínico fetal en las hijas; lo que se pondría de manifiesto con alteraciones en estos órganos reproductivos luego del nacimiento.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo General

Evaluar el impacto de las variaciones nutricionales en gestaciones avanzadas de hembras rumiantes sobre los niveles plasmáticos de GLU e IGF1 de las crías neonatales y el grado de desarrollo ovárico/uterino en las corderas y función ovárica en las terneras alrededor de la pubertad.

1.6.2. Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de las variaciones nutricionales en gestaciones avanzadas sobre los niveles de GLU, IGF1 y E2 maternos previos al parto.
- Determinar si la excesiva condición corporal en vacas lecheras gestantes o la restricción nutricional al final de la gestación en ovejas afectan los niveles de GLU, IGF1 y E2 en las crías neonatales
- Evaluar el efecto de la excesiva CC en vacas con gestaciones avanzadas sobre la función ovárica y niveles de AMH en las hijas alrededor de la pubertad.
- Evaluar el efecto de la restricción nutricional al final de la gestación en ovejas sobre el desarrollo histológico y nivel de expresión génica de IGF-1 y sus receptores en los ovarios y útero de las corderas hijas a los 2 meses de edad

CAPITULO 2: MODELO BOVINO

2.1. Introducción

El período de vaca seca (y de transición) es un tiempo crítico y de gran importancia en el ciclo de la lactancia de las vacas lecheras. Debido a la alta oferta nutricional durante este período y los efectos anabólicos de la preñez, es frecuente la presencia de animales con excesos de condición corporal (CC) al parto, especialmente bajo condiciones de confinamiento. Si bien se ha avanzado mucho en el entendimiento de las consecuencias de este fenómeno sobre el desempeño productivo (menores producciones de leche en la lactancia siguiente, mayores pérdidas de CC postparto y mayores tasas de rechazo (Samanc y col., 2011)), metabólico (mayor incidencia de hígado graso, cetosis, hipocalcemia, displasia de abomaso (LeBlanc 2015)), sanitario (menores o alteradas respuestas inmunológicas y mayor incidencia de endometritis (Trevisi y col., 2012; Wittrock, 2012)) y reproductivo (retención de placenta, endometritis, menores tasas de preñez (LeBlanc 2015)) en las vacas durante el postparto, son pocos los estudios de investigación que han hecho énfasis en los efectos que se podrían originar en los fetos y repercutir en el desempeño de la cría luego de nacida.

Los rumiantes en gestaciones avanzadas con elevada CC presentan una gluconeogénesis hepática incrementada pero menor sensibilidad periférica a la INS y, similar a la Diabetes Mellitus tipo II en humanos, se altera la homeostasis de la GLU. En promedio, las vacas lecheras experimentan una reducción del consumo voluntario cercano al 30% a medida que se acercan al parto (LeBlanc, 2015). Pronto comienza una movilización del tejido adiposo materno (producto del Balance energético negativo -BEN- que se desarrolla) con liberación de ácidos grasos no esterificados (AGNE), bloqueándose la señalización de la INS, contribuyendo a la resistencia a la INS. En consecuencia, se ve agravada la lipólisis y comienzan a aumentar los niveles sanguíneos de AGNEs (LeBlanc, 2015).

Este fenómeno genera que el feto se vea expuesto a elevadas concentraciones de GLU materna pero, debido a la resistencia a la INS, no es capaz de aprovecharla, resultando por ende en condiciones de hipoglucemia y BEN fetal hacia el final de la gestación (Spiegler y col., 2014). Siendo la GLU el principal nutriente requerido por los fetos en desarrollo (Battaglia y Meschia 1978), cualquier alteración en el suministro de la misma puede ocasionar trastornos profundos en el metabolismo del feto (Spiegler y col., 2014).

Existe una compleja relación entre el eje metabólico y reproductivo, ya que las concentraciones de INS/GLU regulan los niveles circulantes del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) (Oliver y col., 1993). Se ha reportado que el IGF-1 es crítico para el desarrollo reproductivo de la hembra, interviniendo a nivel ovárico en la regulación de la proliferación, diferenciación y esteroidogénesis de las células foliculares, siendo un inductor de mitosis en las células de la granulosa, incluso en ausencia de FSH (hormona foliculo estimulante), y aumentando la receptividad celular a la FSH, en animales domésticos (Toori y col., 2014; Demeestere y col., 2004). A nivel uterino, regulan la proliferación y desarrollo de la mucosa y capas musculares a través de sus receptores desde etapas gestacionales tempranas hasta postnatales y se ha observado que intervienen en muchos tejidos regulando la respuesta a las hormonas esteroideas (Taylor y col., 2001).

A partir de la problemática planteada surge la hipótesis de que la alta CC materna al final de la gestación llevaría a hipoglucemia fetal y menores niveles circulantes de IGF-1, afectando por ende el desarrollo reproductivo de las terneras, manifestándose. El objetivo es evaluar el impacto de la alta CC al final de la gestación en vacas lecheras estabuladas sobre la glucemia y niveles de IGF1 de las terneras hijas durante las primeras semanas posparto, y la funcionalidad ovárica alrededor de la pubertad.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Animales

Se utilizaron vacas Holstein (N=10) ubicadas en un establecimiento lechero de alta producción en la localidad de Coronel Moldes, al sur de la provincia de Córdoba, Argentina (GPS: Latitud: 33°34'42.15"S y Longitud: 64°37'14.56"O). El mismo cuenta con 220 - 240 vacas en ordeño y producción diaria promedio de 26 litros por animal, con sistema de pariciones anuales y continuas, y reposición propia (35% anual). Los animales se disponen en corrales recibiendo dietas totalmente mezcladas (TMR) 2 veces por día. El servicio se realiza por inseminación artificial (IA) a celo detectado, utilizando pajuelas de semen sexado.

Se seleccionaron animales entre 3 y 6 años de edad, al inicio del secado, con 50 a 60 días de pre-parto (preñadas de hembras) y similares características reproductivas y sanitarias.

Se confeccionaron 2 grupos de estudios en función al sistema de clasificación de condición corporal (CCC) de 5 puntos propuesta por Ferguson y col. (1996):

Grupo Control o "C" (n=5): animales con $CCC \geq 2.5$ y ≤ 3.75

Grupo Gordas o "G" (n=5): animales con $CCC \geq 4$.

Las categorías en las hijas (h) son las siguientes:

Grupo Control o "Ch" (n=5): terneras hijas de madres "C"

Grupo Gordas o "Gh" (n=5): terneras hijas de madres "G".

2.2.2. Toma de muestras

Se obtuvieron 3 muestras de sangre de la vena coccígea de vacas durante el período de secado, semanalmente hasta el parto, para la determinación de las concentraciones sanguíneas de GLU (realizada in-situ) e IGF-1 y E₂ en las últimas muestras pre-parto. Las muestras se colectaron en tubos de vidrio y se trasladaron en hielo hacia el laboratorio del

Departamento de Reproducción de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC) para ser centrifugadas a 3000 rpm durante 20 minutos para la separación del suero, los cuales fueron posteriormente mantenidos a -20°C.

Para la obtención de muestras en las terneras, durante el primer mes de vida se obtuvieron semanalmente muestras de sangre para dosaje de GLU (in-situ) e IGF-I y E₂ en la última muestra. Las extracciones se realizaron de la vena yugular respetando las normas de higiene y manipulación del animal y con un mínimo de 2 horas desde la última comida, y las muestras se colectaron y procesaron de la misma manera que para las vacas.

Cuando las terneras tuvieron alrededor de los 12 meses de vida se les extrajo una muestra de sangre por animal de la vena yugular. Se colectaron en tubos vacutainer y fueron rápidamente trasladadas en hielo a un laboratorio privado cercano para centrifugarlas a 3000 rpm durante 20 a 30 minutos para la separación del suero. Posteriormente fueron congeladas y enviadas al Laboratorio Zyvot® para la determinación de las concentraciones de hormona anti-Mülleriana (AMH).

2.2.3. Medición de metabolitos sanguíneos

Los niveles de GLU se determinaron in-situ con el dispositivo ACCU-CHEK Performa. La determinación de IGF1 y E₂ fue realizado por radioinmuno-análisis (RIA) en el laboratorio IBYME (CONICET). Para el IGF-1 se hizo una extracción previa con HCl-etanol y crioprecipitación, mientras que el E₂ se extrajo con éter etílico (Lacau-Menjido y col., 2000). Se utilizó el kit comercial para humanos AMH Gen II ELISA (Beckman Coulter Inc., Brea, CA) para la medición de las concentraciones de AMH bovina, siguiendo las instrucciones del fabricante. El rango de linealidad fue de 0,14 ng/ml a 21 ng/ml.

2.2.4. Función Ovárica

Previa constatación de la presencia de estructuras ováricas por palpación rectal, las terneras de alrededor de los 12 meses de edad fueron enroladas al siguiente protocolo:

- Día 0: inyección de 2ml de Benzoato de estradiol IM y aplicación de un dispositivo intravaginal de 0,5g de Progesterona para sincronizar la emergencia de onda folicular.
- Día 4, emergencia de la nueva onda folicular (Bó y col., 2002): se realizaron ecografías transrectales (ecógrafo WED-3100V multifrecuencia, equipado con transductor lineal a 8.5 MHz de frecuencia) de los ovarios evaluándose presencia o ausencia de folículo/s dominante/s y diámetro del folículos dominantes.

2.2.5. Análisis estadístico

Los resultados de GLU materna y de las hijas, y los niveles de IGF-1 de las hijas fue analizado como medidas repetidas en el tiempo en un modelo mixto utilizando el procedimiento MIXED de SAS (SAS Version 9.2 for Windows, SAS Institute, Cary, NC, USA), considerando al animal como efecto aleatorio. El modelo incluyó el efecto de la condición materna y la edad y la interacción entre ambos términos. El resto de las mediciones fueron analizadas por ANOVA, utilizando el procedimiento GLIMMIX de SAS, con el animal tratado como efecto aleatorio. Los datos son expresados como valor medio \pm la DE para cada edad. Los resultados fueron considerados significativos cuando el valor p fue menor a 0,05, mientras que un valor p entre 0,05 y 0,1 fue considerado una tendencia.

2.3. Resultados

2.3.1. Concentraciones sanguíneas de GLU e IGF-1 en vacas

El efecto de la condición materna afectó significativamente los niveles de GLU ($p=0,003$). Los niveles de GLU incrementan hacia la semana parto para cada grupo, aunque esta variación no fue significativa ($p=0,7$), y no hubo interacción significativa entre la condición materna y la edad gestacional. Los niveles séricos de GLU fueron significativamente mayores ($p<0,05$) en los animales del grupo "G" durante las dos últimas semanas previas al parto comparado con los niveles séricos de GLU para las vacas en el grupo "C", mientras que para la semana -3 las diferencias son claramente apreciables pero carecen de significancia estadística (Figura 2.1.).

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) entre los grupos "C" (53.57 ± 4.65 ng/ml) y "G" (48.53 ± 31.2 ng/ml).

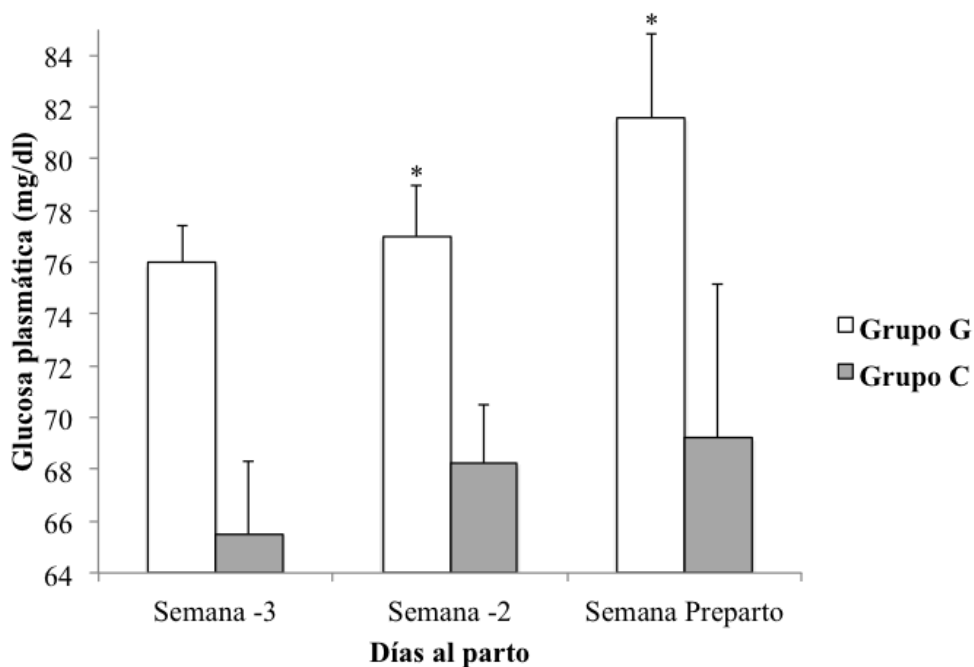


Figura 2.1.: Niveles promedio de glucosa sanguínea en vacas Holstein durante el período de secado con condiciones corporales < 4 (Grupo Control o "C") o ≥ 4 (Grupo Gordas o "G") (* $p < 0,05$).

2.3.2. Concentraciones sanguíneas de E_2 en vacas

Aquí se pudo observar una diferencia muy significativa entre los grupos de estudios ($p=0,004$). El grupo G presentó niveles de E_2 muy inferiores y con mínimas variaciones entre animales; mientras que en el grupo C los niveles de E_2 llegaron a ser 2 o 3 veces mayores.

En el gráfico de cajas (box-plot) se puede apreciar la Mediana (ME) de concentración de E_2 sanguíneo para el grupo C fue de 65 pg/ml mientras que para el grupo G fue de 35 pg/ml (Figura 2.2.).

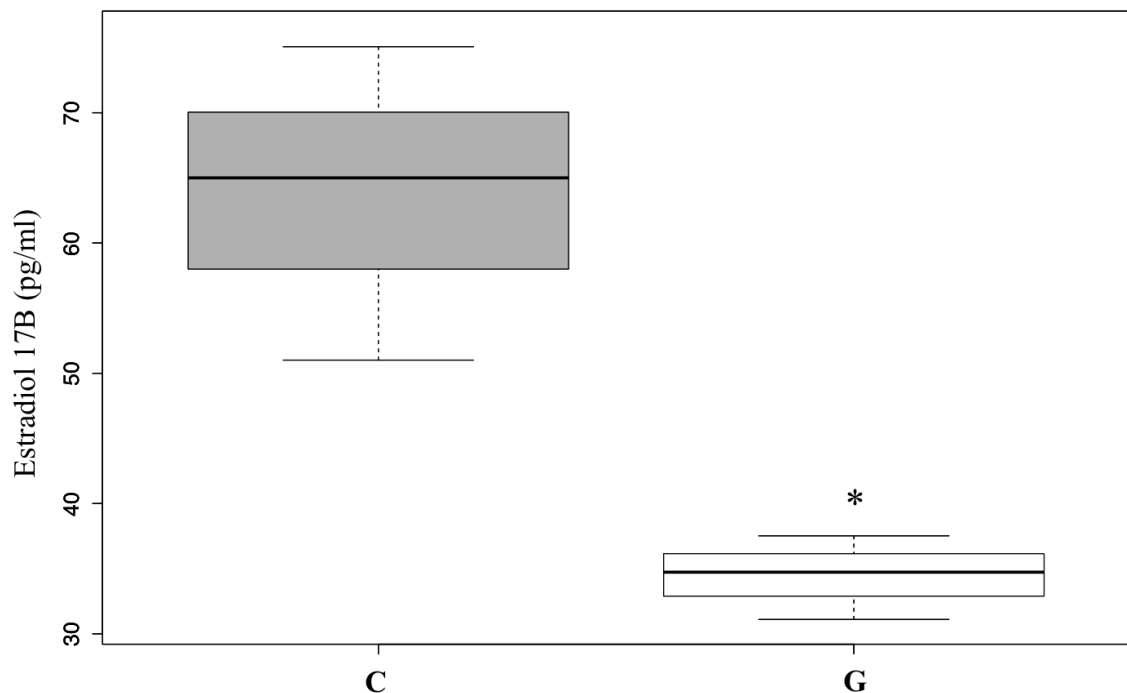


Figura 2.2.: Niveles sanguíneos de estradiol en vacas Holstein durante el período de secado con condiciones corporales < 4 (Grupo Control o "C") o ≥ 4 (Grupo Gordas o "G") (* $p=0,004$).

2.3.3. Concentraciones sanguíneas de GLU en terneras

El efecto de la condición materna afectó significativamente los niveles de GLU en las terneras durante el primer mes de vida ($p=0,04$). La edad de las terneras durante el primer mes de vida también afectó significativamente los niveles de GLU para cada grupo ($p=0,01$), y no hubo interacción significativa entre la condición materna y la edad de las terneras ($p=0,5$). Los niveles de GLU sanguínea difirieron entre las terneras en los primeros 2-4 días de nacidas, con valores significativamente menores para el grupo "Gh" ($p<0,05$). Alrededor de la 1er semana de vida se mantuvieron las diferencias entre los grupos aunque mostraron una tendencia ($p=0,1$). Durante la 2da semana las concentraciones sanguíneas de GLU fueron similares y se mantuvieron así hasta el primer

mes de vida. A lo largo de este período, el grupo de terneras "Ch" mantuvo concentraciones de GLU estables y con mínimas variaciones (Figura 2.3.).

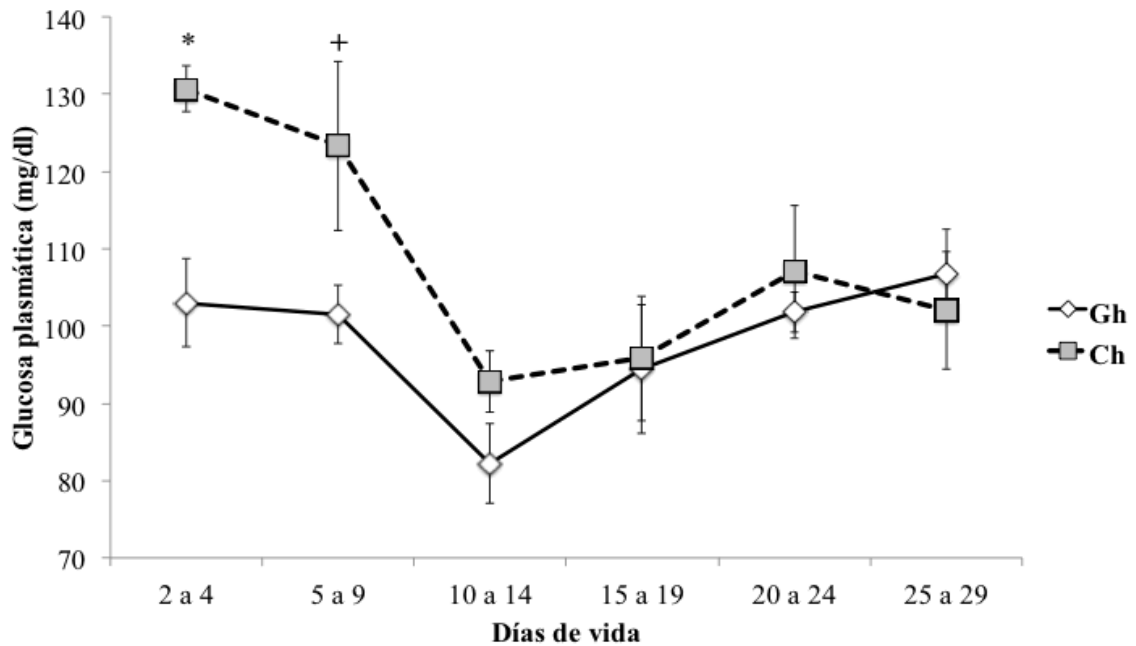


Figura 2.3.: Niveles promedio de glucosa sanguínea en terneras Holstein durante el primer mes de vida nacidas de madres con condiciones corporales < 4 (Grupo Control o "Ch") o ≥ 4 (Grupo Gordas o "Gh") durante el período de secado (* $p < 0,05$; + $p = 0,1$).

2.3.4. Concentraciones sanguíneas de IGF-1 en terneras

Similar a los niveles de GLU, el efecto de la condición materna también afectó significativamente los niveles de IGF-1 en las terneras durante el primer mes de vida ($p = 0,0001$). Sin embargo, y aunque se observan fluctuaciones, la edad de las terneras no tuvo efecto sobre los niveles de IGF-1 para cada grupo ($p = 0,25$), y no hubo interacción significativa entre la condición materna y la edad de las terneras ($p = 0,18$). Los niveles de

IGF-1 a lo largo del primer mes de vida fueron siempre mayores para las terneras del grupo "Ch", con valores que fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) hacia la segunda semana de vida, comparado con los valores de IGF-1 de las terneras grupo "Gh". Hacia los 20 días postnacimiento se mantuvo una tendencia ($p = 0,06$) a favor de de las terneras del grupo "Ch", no siendo significativo a partir de la 3er semana en adelante (Figura 2.4.).

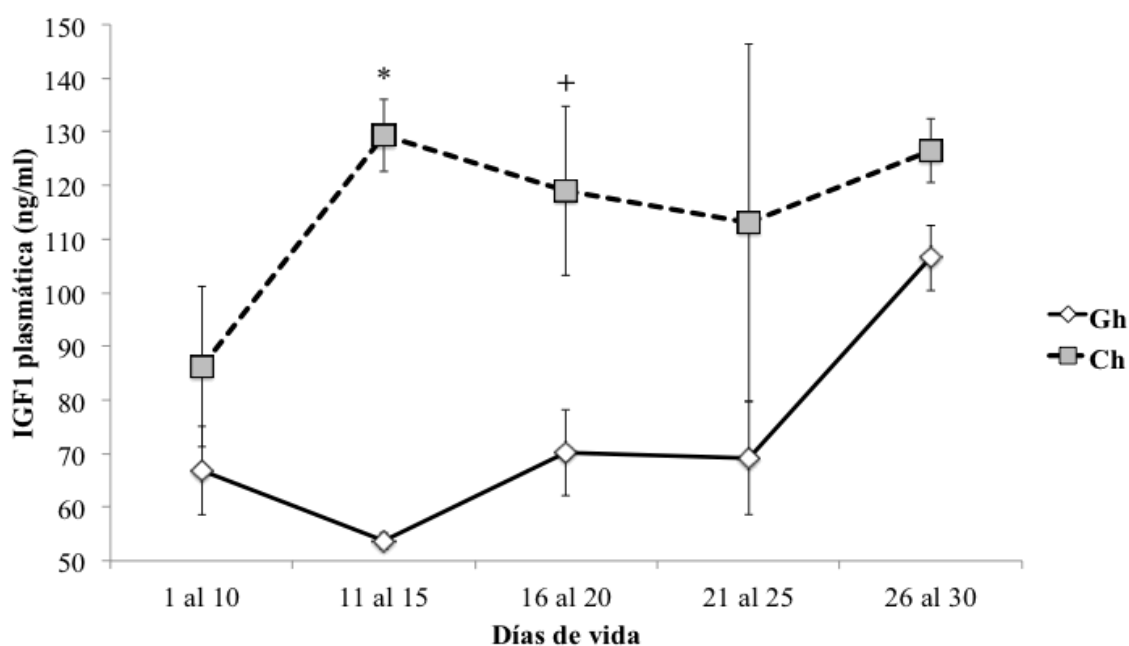


Figura 2.4.: Niveles promedio de IGF-1 sanguíneos en terneras Holstein durante el primer mes de vida nacidas de madres con condiciones corporales < 4 (Grupo Control o "Ch") o ≥ 4 (Grupo Gordas o "Gh") durante el período de secado (* $p < 0,05$; + $p = 0,06$).

2.3.5. Concentraciones sanguíneas de E_2 en terneras

Similar al caso de las madres, las terneras del grupo "Ch" tuvieron una producción media de E_2 significativamente mayor ($p = 0,007$) hacia el primer mes de vida postnatal. La

Mediana de los datos pertenecientes al grupo "Gh" es al menos 2 veces menor a la ME del grupo "C" (Figura 2.5.).

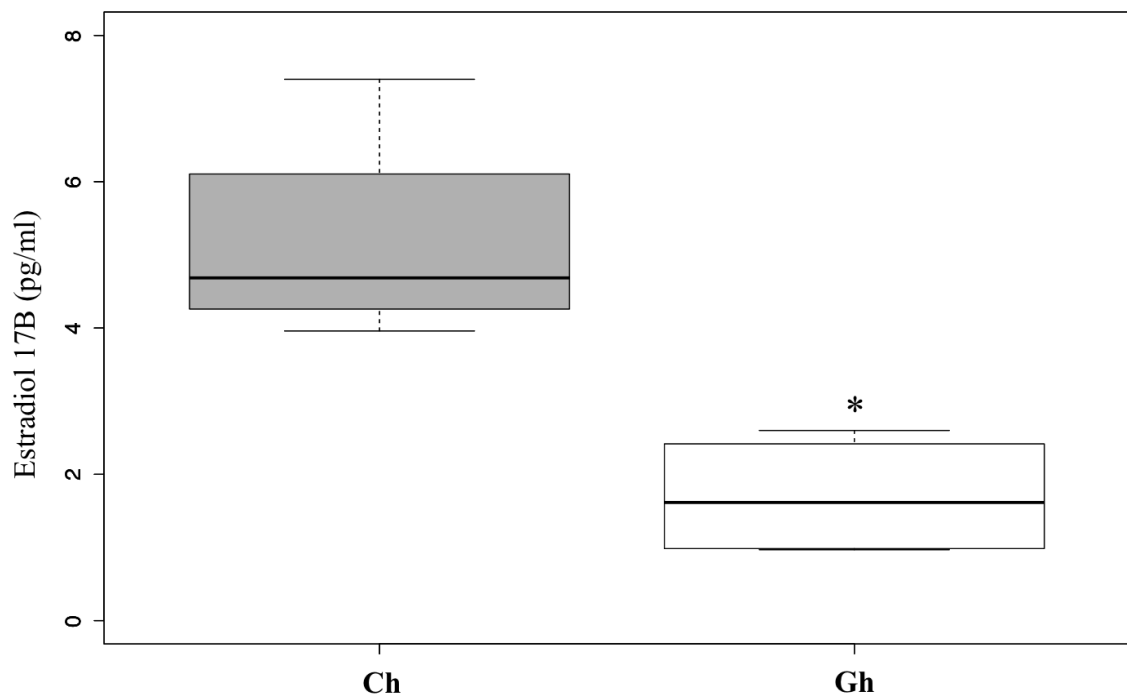


Figura 2.5.: Niveles sanguíneos promedio de estradiol en terneras Holstein durante el primer mes de vida nacidas de madres con condiciones corporales < 4 (Grupo Control o "Ch") o ≥ 4 (Grupo Gordas o "Gh") durante el período de secado (* $p=0,007$).

2.3.6. Concentraciones sanguíneas de AMH en terneras Holstein de alrededor de 12 meses de edad

Las concentraciones sanguíneas de AMH no difirieron en forma significativa entre los grupos de terneras de alrededor de un año de vida. Las Medianas mostraron una tendencia ($p=0,1$) a menor valor de AMH para el grupo Gh (Figura 2.6.).

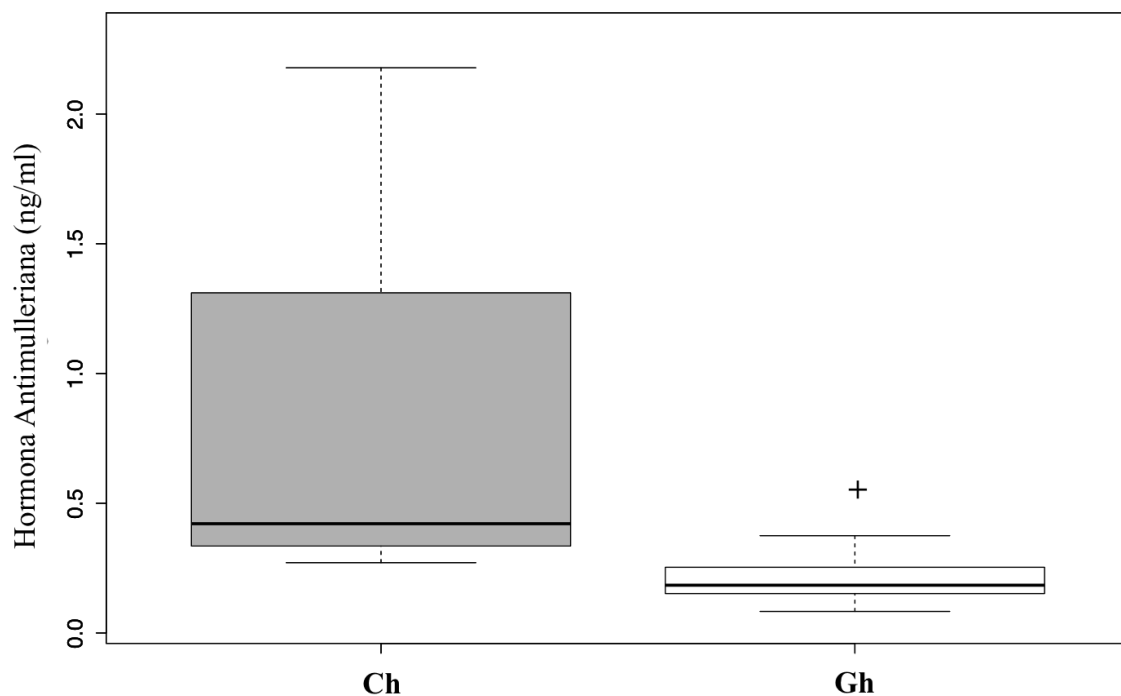


Figura 2.6.: Niveles sanguíneos promedio de hormona anti-mülleriana (AMH) en terneras Holstein alrededor de los 12 meses de vida nacidas de madres con condiciones corporales < 4 (Grupo Control o "Ch") o ≥ 4 (Grupo Gordas o "Gh") durante el período de secado ($^+p=0,1$).

2.3.7. Evaluación folicular en terneras Holstein de alrededor de 12 meses de edad

Todas las terneras presentaron folículos dominantes al momento de la evaluación ecográfica. A su vez, hubo una tendencia ($p=0,1$) a un mayor diámetro del folículo dominante en las vaquillonas pertenecientes al grupo "Ch" comparado con las vaquillonas del grupo "Gh" (Figura 2.7.).

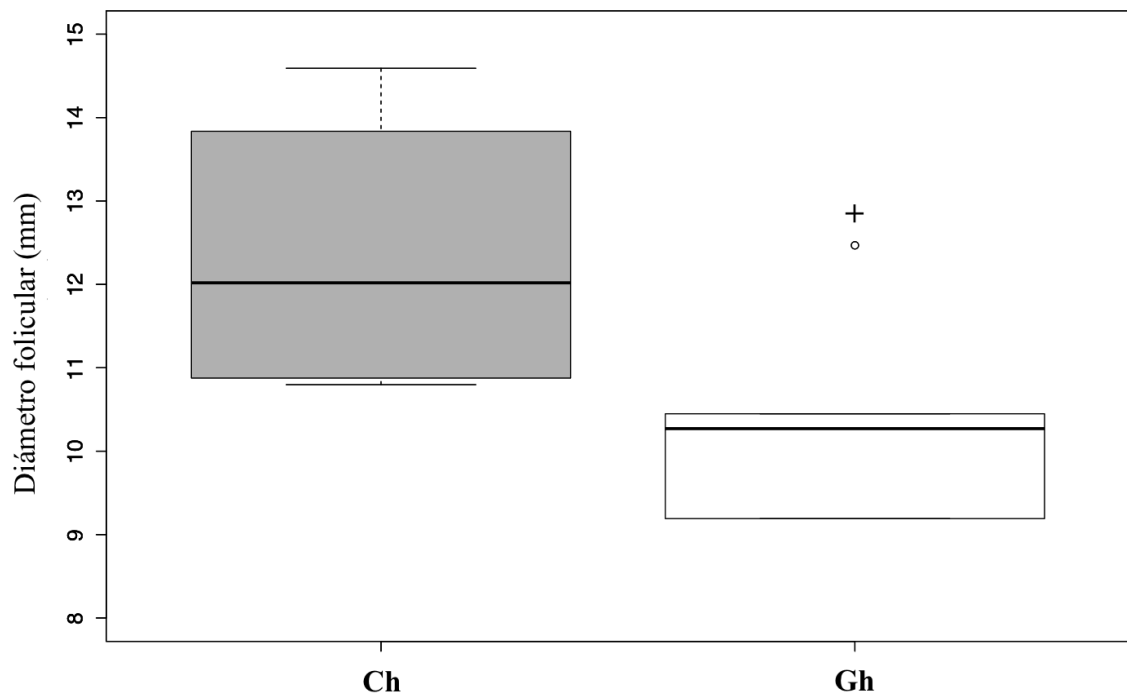


Figura 2.7.: Diámetros de folículos ováricos de terneras de alrededor de 12 meses de edad nacidas de madres con condiciones corporales < 4 (Grupo Control o "Ch") o ≥ 4 (Grupo Gordas o "Gh") durante el período de secado. ($^+p=0,1$).

2.4. Discusión

Si bien se ha observado que aumentos en los niveles de ingesta materna en vacas de carne (en condiciones de cría bovina) durante el último trimestre de gestación ha tenido efectos benéficos en la fertilidad de las crías (Cushman y col., 2014; Martin y col., 2007), en la mayoría de los casos se ha relacionado la excesiva CC de vacas lecheras a enfermedades del parto con grandes impactos económicos/productivos. Por otra parte, se ha demostrado en ovejas que la obesidad materna podría llevar a retardos en el desarrollo placentario y restricciones de crecimiento en los fetos, incrementando las tasas de mortalidades postnatales (Wallace y col., 2003), alterando la función metabólica de

órganos, como el hígado y músculo esquelético (Brameld y col., 2000) y afectando el desarrollo ovárico (Da Silva y col., 2003).

En este estudio hemos observado que las terneras nacidas de vacas que llegaron al momento del parto con una excesiva CC podrían tener afectado el desarrollo folicular durante la vida reproductiva.

Esta premisa es de suma importancia en las producciones animales, considerando que la descendencia representa el futuro económico y productivo de las mismas.

2.4.1. Niveles de GLU, IGF-1 y E₂ Maternos

Las vacas lecheras desarrollan cierta resistencia periférica a la INS a medida que se acercan al final de la gestación, por lo que se necesitarían mayores concentraciones de INS sanguínea para controlar los niveles metabólicos de GLU (Holtenius y Holtenius, 2007). En nuestro experimento pueden observarse indicios sobre ello, donde las vacas del grupo "C" presentaron un aumento gradual no significativo de las concentraciones de GLU a medida que se acercaron al parto. Para el caso del grupo "G", los niveles de GLU sanguíneos fueron significativamente más elevados comparado con el grupo "C" (Figura 2.1). Basado en un importante número de trabajos de investigación en donde se relacionan elevados consumos de energía al final de la lactación o vacas no lactantes, con elevadas CC y niveles de GLU sanguíneas (Baruselli y col., 2016; Spiegler y col., 2014; Leiva y col., 2015; Adamiak y col., 2005; Hostenius y col., 2003), se podría inferir que la resistencia a la INS en el grupo de vacas "G" se origina debido a una serie de eventos (resistencia a la INS fisiológica previo al parto, disminución de consumo, BEN, gluconeogénesis aumentada, lipólisis con elevada producción de AGNEs, exacerbando la resistencia a la INS (LeBlanc, 2015)) que sumados a un período de nula producción lechera serían altamente predispuestas a este síndrome de hiperglucemia/hiperinsulinemia

durante el pre-parto. La ausencia de interacción entre la CC materna y el tiempo gestacional es indicador de que el efecto de la primera sobre los niveles de GLU es constante y que no es dependiente de la segunda (por lo menos para las 3 semanas previas al parto).

Debido a la íntima relación que existe entre los niveles de GLU e INS con los de IGF-1, hubiese sido factible de observar diferencias de valores de este último entre grupos. Sin embargo, los niveles de IGF-1 maternos no mostraron diferencias.

Los niveles de E_2 sanguíneos en las madres fueron significativamente inferiores en el grupo "G" en comparación con el grupo "C" (Figura 2.2). Distintos trabajos han informado que vacas lecheras con excesiva CC u obesas presentan mayor flujo sanguíneo hepático y elevado metabolismo de hormonas esteroideas (clearance) justificando las menores concentraciones de E_2 sérico (Sangsritavong y col., 2002). Esta es la razón por la que vacas obesas presentan folículos ovulatorios más grandes (y menor expresión de celo) para alcanzar el pico de E_2 necesario para estimular a nivel central la liberación del pico preovulatorio de LH (Sartori y col., 2013). Lemley y col. (2014) también observaron este fenómeno en ovejas sobrealimentadas durante el 3/3 de gestación y que presentaron menores niveles de E_2 sanguíneo. Los autores atribuyeron esta condición a mayor metabolismo hepático, menor producción placentaria (especialmente importante en la última etapa de la gestación de algunas especies como los ovinos, y humanos, y producido por los placentomas, los cuales representan las zonas de unión materno-fetales y que serían en el vaca una fuente accesoria o secundaria de E_2) o una combinación de ambas. En concordancia con el trabajo anterior y sin importar el origen del E_2 sanguíneo, un aspecto muy importante a considerar es que las hormonas esteroidales y especialmente el E_2 interviene en la regulación primaria de la angiogénesis (desarrollo de vasos sanguíneos) de la placenta (Wallace y col., 2008). Varios trabajos de investigación que estudiaron ovejas preñadas con excesiva CC hacia el segundo y tercer tercio reportaron que los animales presentaron bajas concentraciones de E_2 y una menor e insuficiente perfusión placentaria (30% menor) para cubrir las demandas nutricionales y metabólicas del feto en fase de

crecimiento exponencial, resultando en fetos ~30% más pequeños que el grupo control (Wallace y col., 2008, 2003, 2001, 2000). A su vez, se cree que elevados niveles de INS e IGF-1 (en nuestro trabajo, no se observaron diferencias entre los grupos de estudio) durante la gestación, produciría un estímulo anabólico hacia los tejidos maternos (mayor deposición de grasa), mientras por otro lado la secreción hormonal y desarrollo placentario se verían comprometidos (Wallace y col., 2008).

Una última razón que justifique las menores concentraciones de E₂ sérico radicaría en una disfunción ovárica y folicular producto de la alteración hormonal que involucra este síndrome de hiperglucemia/hiperinsulinemia, disminuyendo la calidad de los ovocitos (Adamiak y col., 2005) y alterando la foliculogénesis (Baruselli y col., 2016) y con esto la producción de hormonas esteroideas.

2.4.2. Niveles de GLU e IFG-1 en las crías

Los niveles de GLU sanguíneos en los mamíferos se regulan a través de las secreciones pancreáticas de glucagón e INS y la sensibilidad de los tejidos periféricos a estas hormonas (Spiegler y col., 2014). Por otra parte, existen en el feto distintos mecanismos de adaptación que preservan funciones metabólicas esenciales a expensas por ejemplo, de su propio crecimiento. Esta condición es exacerbada en cercanías al parto, cuando se daría el máximo crecimiento fetal sumado a un pobre suministro de nutrientes por parte de la placenta materna (Wallace y col., 2007).

En nuestro estudio, los niveles de GLU sanguíneas fueron diferentes entre los grupos para las crías postnatales, especialmente la primer semana, en donde se observan valores de GLU significativamente menores en el grupo "Gh" en comparación con el grupo "Ch" (Figura 2.3). A su vez, se encontró una ausencia de interacción entre CC materna y la edad de las crías indicando que el efecto de la condición materna sobre los niveles de

GLU es constante e independiente de la edad de la ternera (por lo menos para el primer mes de vida). En relación al cuadro de resistencia a la INS y menor consumo que experimentan las madres en el período preparto, es posible especular que el grupo de terneras "Gh" haya presentado un fenómeno de "arrastre" del BEN vivido durante su vida fetal y el cual se refleja durante la primera semana posterior al parto. Posterior a ello, pareciera haber cierto ajuste reflejado en la ausencia de diferencias entre grupos.

Los IGF-1 juegan un rol muy importante en el destino de los nutrientes corporales, estimulando proliferación, diferenciación y metabolismo celular. Actúan sinérgicamente con la INS y son reguladas por los niveles de GLU séricos (Mognet y Martin, 1997). A nivel ovárico intervienen en múltiples procesos, aumentando el número de las células de la granulosa (mitosis celular), favoreciendo la esteroidogénesis (aumentando la producción de E₂) y foliculogénesis (aumentando los receptores de FSH en las células de la granulosa), siendo muy importantes también en la fertilización, implantación y desarrollo embrionario (Toori y col., 2014; Rivas López y col., 2011). A su vez, se ha comprobado en ovejas, la presencia de receptores para IGF-1 en las capas mucosas y muscular de la placenta y en los oviductos, y la producción local de IGF-1 a nivel uterino y placentario, sugiriendo el importante rol que éstos tienen en el desarrollo y crecimiento del tracto reproductor de la hembra (Igwebuike y col., 2010).

En el presente trabajo puede observarse que hubo una diferencia significativa en los niveles de IGF-1 entre los grupos hacia la 2da semana de vida ($p < 0,05$), con concentraciones sanguíneas 2 veces mayores para el grupo "Ch". Hacia la tercera semana se mantuvo la tendencia ($p = 0,06$), perdiendo significancia estadística hacia el mes de vida (Figura 2.4). Mognet y Martin (1997) plantean que los niveles de IGF-1 son relativamente estables durante el día y que después de un período de restricción nutricional aguda o crónica se alteran. Es importante resaltar que las terneras del grupo "Gh" se encontrarían en BEN desde algún tiempo antes del parto (basado en el trabajo de Wallace y col., 2008), lo cual se ajustaría al cuadro crónico planteado por los investigadores anteriores. Esto se

vería reflejado en la gran similitud que existe entre las curvas de GLU e IGF-1 de las terneras "Gh", lo que respaldaría al menos en parte nuestra especulación anterior.

Uno de los modelos animales más utilizado para evaluar el efecto materno sobre la fisiología de la cría es la oveja. Wallace y col. (2008) reportaron que una de las causas del BEN fetal en gestaciones avanzadas de animales con excesiva CC es el menor desarrollo placentario, producto de un desbalance hormonal (E_2) y con falla en la perfusión sanguínea. Los fetos en ese trabajo, a menos de 2 semanas de nacer, presentaron menores concentraciones de GLU, INS e IGF-1 comparadas con el grupo control.

En los bovinos el desarrollo de las glándulas uterinas comienza durante el último mes de gestación, continúa entre el nacimiento y los 3 meses de vida con un extenso desarrollo glandular, aumentando gradualmente de tamaño hasta la pubertad con las características histológicas propias de un útero adulto (Wiley y col., 1987). En base a todo lo anteriormente mencionado es posible especular que las menores concentraciones de IGF-1 fetales y posterior al parto podrían repercutir en el desarrollo de los ovarios y útero, ya que como fuera anteriormente mencionado, los IGF-1 intervienen en el desarrollo reproductivo de la hembra desde etapas muy tempranas de la gestación y durante el postparto, en sinergismo con los niveles de E_2 ovárico (Taylor y col., 2001).

2.4.3. Niveles sanguíneos de E_2 en las crías

La producción ovárica de E_2 comienza en la vida intrauterina y hacia el último tercio de gestación el eje hipotálamo-hipófisis-ovárico se considera completamente funcional (Da Silva y col., 2002). Asimismo se ha informado que la presencia de IGF-1 durante la fase de crecimiento folicular aumenta la producción de E_2 (Demeestere y col., 2004).

Existe cierto sinergismo entre los IGF-1 y E₂ a nivel uterino en animales neonatales, en donde los primeros son estimulados por los niveles de E₂ sérico y mediante su receptor uterino, ESR-1, aumenta la expresión génica para el receptor de IGF-1, comandando entre otras cosas, el crecimiento y desarrollo de ovarios y úteros desde los primeros días de vida hasta la pubertad en ovejas, cerdas y ratas (Taylor y col., 2001). Basado en el patrón de crecimiento postnatal descrito por Honaramooz y col., (2004) y Wiley y col., (1987), este sería el mecanismo en terneras también.

En el presente estudio, los niveles posnatales de E₂ en las terneras difirieron en forma muy significativa entre los grupos de estudio, reflejando fuerte merma en el grupo "Gh", dando una clara señal de disfunción endócrina a nivel ovárico (Figura 2.5). Con menores diámetros foliculares (Figura 2.7) sería esperable obtener menores niveles séricos de E₂ al año de vida.

Honaramooz y col. (2004) realizaron ecografías desde la 2da semana de vida en vaquillonas Holstein. Allí observaron un patrón de crecimiento bifásico en los ovarios y aparato tubular (útero, cérvix y vagina) consistente en una fase de crecimiento rápida entre las 2 y 14 semanas (ovarios) y 10 semanas (útero), un período de estancamiento o "plateau" y una segunda fase de crecimiento desde la semana 32 hasta la primera ovulación que tuvo lugar alrededor de las 60 semanas de vida. Una importante relación se observó entre el desarrollo del aparato tubular en función al grado de desarrollo ovárico; aquellos folículos más grandes serían más estrogénicos y cumplirían un rol importante en el desarrollo uterino pre-puberal. Otros investigadores han encontrado resultados similares en roedores (Baker y col., 1996) y ovejas (Taylor y col., 2000, 2001) informando los importantes efectos del E₂ a nivel uterino, favoreciendo el crecimiento de todas sus capas en las crías con poco tiempo de vida.

Sin embargo, para otros investigadores (Carpenter y col., 2003), el crecimiento uterino y glandular es un proceso independiente de las concentraciones de estrógeno circulante en corderas (ratas y cerdas) desde el nacimiento hasta los 56 días de vida.

Los resultados en nuestro estudio, muestran que existe relación entre los niveles de IGF-1 y E₂, y que ambas concentraciones séricas son bajas en las terneras "Gh" comparadas con los niveles en las terneras "Ch" y que a su vez, existiría relación con los niveles séricos de GLU neonatales. (Figura 2.3, 2.4 y 2.5). En base a las evidencias científicas anteriormente nombradas, es factible esperar diferencias en el desarrollo de los ovarios y úteros de las terneras entre los grupos. También sería esperable que estas diferencias se manifiesten durante la vida reproductiva adulta del animal con fuerte impacto en las tasas de preñez.

2.4.4. Niveles sanguíneos de AMH y diámetro folicular en las crías

Los folículos ováricos de la mayoría de las especies domésticas se forman durante la vida intrauterina, y en el bovino el número ronda entre los 2,1 millones de folículos primordiales hacia el segundo tercio de gestación y disminuye hasta unos 130.000 al nacimiento, con muy alta variabilidad entre individuos (Evans y col., 2012). Este número es llamado reserva folicular ovárica (RFO) y se ha relacionado con la fertilidad del animal debido, entre otras cosas, a que determina el número de folículos entrantes en cada onda folicular (población folicular antral, PFA, característica de alta repetibilidad en cada individuo), respuesta superovulatoria y longevidad reproductiva (Ireland y col., 2011). La hormona AMH es una glicoproteína producida por folículos preantrales y antrales pequeños (Ribeiro y col., 2014), que ha mostrado una fuerte relación con la PFA y RFO (Jimenez-Krassel y col., 2015; Martínez y col., 2015; Ribeiro y col., 2014; Mossa y col. 2012), con concentraciones relativamente estables en todo el ciclo estral del animal que además de otorgarle gran practicidad a su diagnóstico, la postula como un marcador endócrino para la identificación de aquellas hembras con mayor RFO y PFA para

tratamientos de superovulación y transferencia de embriones (Baruselli y col., 2015; Rico y col., 2009). En nuestro experimento, hubo una tendencia ($p=0,1$) a menor valor sanguíneo de AMH para el grupo de terneras "Gh" (Figura 6). Esto podría indicar una menor población de folículos presentes en cada onda folicular, como fue demostrado por distintos investigadores (Martínez y col., 2015; Ribeiro y col., 2014; Batista y col., 2014; Baldrighi y col., 2013; Mossa y col. 2012). Animales con diferentes PFA podrían presentar diferencias en una serie de características inherentes a la fertilidad, entre ellas, niveles sanguíneos de hormonas (Mossa y col., 2010), grosor uterino (endometrio) y funcionalidad del cuerpo lúteo (CL), (Martínez y col., 2015; Jimenez-Krassel y col., 2009; Rico y col., 2009). Por ejemplo, animales con menores PFA tuvieron menores concentraciones de P4 y endometrios más delgados en distintos momentos del ciclo estral comparados con el grupo de mayor PFA (Jimenez-Krassel y col., 2009). Asimismo, vaquillonas con bajas concentraciones de AMH tuvieron tasas de supervivencias postparto más bajas que sus compañeras durante su vida adulta (Jimenez-Krassel y col., 2015). La PFA tiene una heredabilidad moderada (0,31) y parece haber una correlación entre madre e hijas, lo que permitiría la selección de animales con mayor número de folículos (Weller y col., 2016; Walsh y col., 2014). Modificaciones epigenéticas inducidas por factores como el BEN materno durante la gestación (Mossa y col., 2012), edad materna y estado y/o número de lactancia (Walsh y col., 2014) pueden influir sobre la PFA de las hijas. Estos factores explicarían casos de baja o nula relación entre las concentraciones de AMH materna y el de sus hijas, sobre todo en el ganado lechero. En nuestro trabajo, las madres seleccionadas eran muy similares en términos productivos/reproductivos, y el exceso de CC pudo haber actuado como un factor epigenético que haya alterado el funcionamiento ovárico de las crías, considerando que al mes de vida presentaron diferencias significativas entre los niveles de E_2 (Figura 2.5) y la tendencia a menor valor de AMH para el grupo Gh ($p=0,1$) alrededor de los 12 meses de vida (Figura 2.6). En relación a lo anterior, todas las vaquillonas presentaron estructuras ováricas a la palpación rectal, a 4 días del inicio de la onda folicular (Bó y col., 2002), pero el grupo "Gh" mostró una tendencia ($p=0,1$) a menor diámetro folicular comparado con el grupo "Ch" (Figura 2.7).

Alteraciones en el ADN de las crías durante la última etapa de gestación podrían explicar estos sucesos. Las células que rodean al ovocito (de la granulosa) y este último están en íntimo contacto y las comunicaciones bidireccionales entre ellos resultan críticas para el desarrollo y crecimiento de las células (Bettegowda y col., 2008). Se ha visto en ratas y vacas, que los ovocitos secretan distintas sustancias que promueven el crecimiento celular de las células que lo rodean, su función esteroidogénica, su vitalidad y la muerte celular (Bettegowda y col., 2008). Dado este íntimo contacto entre el ovocito y las células de la granulosa, es posible especular que modificaciones a nivel genómico de las crías, inducidos por factores maternos, afecten permanentemente la estructura celular y/o la expresión para ciertos genes involucrados en el desarrollo folicular ovárico y su capacidad esteroidogénica (IGF-1, E₂, por ejemplo).

Trabajos en ovejas y ratas gestantes reportaron que la excesiva nutrición materna tiene efectos negativos a nivel ovárico fetal, con fuerte disminución en el número de folículos primordiales, primarios, antrales y pre-ovulatorios hacia finales de la gestación, producto de fallas placentarias y niveles de GLU/INS/IGF-1 fetales menores (Cheong y col., 2014; Da Silva y col., 2002). Mediante histopatología, se confirmaron mayores expresiones de genes relacionados a la apoptosis celular (FoXO3a) y desarrollo y crecimiento folicular (GDF9 o factor-9 de diferenciación del crecimiento) a nivel ovárico (Cheong y col., 2014). El FoXO3a es un importante regulador del desarrollo de folículos tempranos (primordiales y primarios) y de la apoptosis de ovocitos, sugiriendo que una menor expresión de este gen es un pre-requisito para el desarrollo folicular (Cheong y col., 2014). El gen GDF9 se relaciona con el crecimiento y desarrollo folicular en todas las etapas de la foliculogénesis, siendo importante mediador para la transición de folículos primordiales a primarios (Vitt y col., 2000). Elevados niveles de este gen inducen crecimiento folicular que llevaría a una reducción de la reserva folicular ovárica durante la vida fetal (Cheong y col., 2014). Más recientemente, y con resultados muy similares a los presentados por el grupo anterior, Weller y col. (2016) observaron elevados niveles de expresión para distintos genes en los ovarios fetales bovinos, entre ellos el GDF9, CASP3 (caspasas) y BAX previo al parto, como consecuencia de excesos nutricionales maternos durante gestaciones avanzadas en vacas multíparas no lactantes. Los genes CASP3 y BAX

son mediadores en la pro-apoptosis celular a nivel ovárico en especies domésticas. En ese estudio se observó una fuerte disminución de folículos primordiales y RFO, pero mayor número de primarios, pre-antrales y antrales en los fetos de las madres que recibieron nutrición en exceso. Una explicación a ello fue un desbalance entre genes que regulan y/o estimulan la apoptosis celular con niveles de CASP3, BCL2 y BAX elevados hacia el inicio del tercer tercio de gestación (Weller y col., 2016; Santos y col., 2013; Erickson, 1996). Otro particular hallazgo del mismo estudio es que no hubo cambios en la expresión para receptores de E₂ en ovarios (ESR1) pero sí hubo una expresión más elevada para los genes StAR y P450arom, enzimas intervinientes en la esteroidogénesis ovárica. Esta última es una enzima presente en las células de la granulosa de folículos primarios, pre-antrales y antrales que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos (Meinhardt y Mullis, 2002). La estimulación excesiva de StAR y P450arom aumentó el pasaje de folículos en estadios tempranos (primordiales y primarios) a secundarios y pre-antrales con diferencias muy importantes en las poblaciones foliculares de los ovarios fetales. Esta condición pudo verse potenciada por los efectos del aumento en la expresión del factor GDF9 (Weller y col., 2016), similar a lo reportado por Cheong y col. (2014). En humanos y vacas también se observó que elevados niveles de catepsinas (enzimas proteolíticas, cercanas a las caspasas) se relacionaron con menores tasas de producción de blastocistos y actividades pro-apoptóticas en las células de la granulosa (Balboula y col., 2013; Bettegowda y col., 2008). En vaquillonas y vacas se relacionaron menores PFA con mayor expresión de genes para catepsinas en las células cumulares (Ireland y col., 2009).

El desarrollo folicular depende de señales autócrinas y paracrinas e involucran un importante número de factores producidos por las células de la granulosa, tecales, intersticiales y ovocitos, muchos de los cuales ya fueron nombrados anteriormente; y mientras se ha descrito el desarrollo ovárico y crecimiento folicular durante la vida fetal, todavía resta mucho para lograr un mayor entendimiento sobre la incidencia de la apoptosis celular en el ovario bovino durante este período y las causas que podrían exacerbarla (Santos y col., 2013). Por ejemplo, se ha visto en bovinos que existe cierto grado de fragmentación de ADN y apoptosis de células del cúmulus durante maduración in-vitro, incluso, entre ovocitos de alta calidad (Bettegowda y col., 2008). Similar a lo que

sucede en el síndrome de "vacas repetidoras", hay aumentos en la expresión de genes pro-apoptóticos, como BAX y ITM2B, durante épocas de verano relacionadas al estrés térmico (Ferreira y col., 2016). Es posible que otros factores maternos que induzcan modificaciones epigenéticas, como los excesos nutricionales, influyan en la programación de mecanismos intervinientes en la apoptosis celular entre las que podrían estar involucradas las células que rodean los ovocitos, con consecuencias sobre la foliculogénesis, capacidad esteroidogénica ovárica y población folicular.

2.5. Conclusión

La CC excesiva de vacas Holstein en gestaciones avanzadas alteran los niveles sanguíneos de GLU y de E₂, llevando a hiperglucemia y menores niveles circulantes de E₂, lo cual puede influir sobre el desarrollo y crecimiento fetal.

Los niveles séricos de GLU e IGF-1 en las crías se vieron afectados como consecuencia de los excesos de CC maternos, con diferencias significativas durante los primeros días (GLU) y primeras semanas (IGF-1) postparto. Esto afectaría el desarrollo de gónadas sexuales femeninas (ovarios) y la foliculogénesis durante su vida postnatal temprana, con menores producciones de E₂ al mes de vida, menores niveles sanguíneos de hormona AMH y menor diámetro del folículo dominante.

Futuras investigaciones podrían ayudar a dilucidar el efecto de la alta CC materna en gestaciones avanzadas sobre la PFO al año de vida, haciendo hincapié en los niveles de expresión para genes intervinientes en la apoptosis celular, al igual que el posible impacto sobre el desarrollo uterino de la descendencia y fertilidad durante su vida adulta.

CAPITULO 3: MODELO OVINO

3.1. Introducción

Las características biológicas y reproductivas de las ovejas y los sistemas de producción muy extensivos de la Argentina predisponen a que el último tercio de la gestación tenga lugar a fines del invierno, cuando hay escasa disponibilidad forrajera. Durante este período gestacional hay una gran demanda de nutrientes, producto del crecimiento exponencial de lo/s feto/s, por lo que es muy común que las ovejas se encuentren bajo condiciones de deficiencias nutricionales (balance energético negativo o BEN) y deban hacer uso de sus reservas corporales. El estatus de nutrición materna es uno de los factores extrínsecos más importantes en la regulación del crecimiento, desarrollo y función de los sistemas de órganos fetales (Funston y col., 2010). Por ello, el concepto de "programación fetal" hace referencia a etapas gestacionales en los que el desarrollo fetal puede verse comprometido o alterado, resultando en modificaciones epigenéticas a nivel genómico y consecuentemente en cambios fisiológicos en el feto que se ponen de manifiesto cuando el animal es adulto (de Boo y Harding, 2006).

La restricción materna durante el último tercio de la gestación conduce a un BEN incluyendo, hipoglucemia e hipoinsulinemia. Como la función de la placenta ante estas condiciones se ve alterada, se origina un BEN en el feto con menores concentraciones de GLU y consecuentemente, disminuciones en los niveles de IGF-I fetales (Edwards y McMillen, 2001; Yuen y col., 2002 ; Oliver y col., 1993).

La superfamilia de los IGFs son proteínas cuyas concentraciones están en íntima relación con las concentraciones de nutrientes. La distribución de sus receptores y proteínas de unión es muy amplia, hallándose a nivel cerebral, ovárico (células de la

granulosa y tecales), uterino, placentario, entre otros, interviniendo en procesos anabólicos y catalíticos, a través de mecanismos endócrinos, autócrinos y parácrinos desde etapas tan tempranas como la embriogénesis hasta la vida adulta, con gran influencia en la vida y performance reproductiva a nivel gonadal y endócrino (Nayak y Giudice, 2003; Mognet y Martin, 1997). Durante la vida intrauterina el IGF-1 regula el crecimiento y desarrollo fetal en forma directa, mientras que durante la vida postnatal la hormona de crecimiento (GH) regula la acción de los IGF-1 a través de la producción sistémica o local de IGF-1 (Randhawa y col., 2005).

El sistema IGF incluye tres ligandos: la INS, el factor IGF-1 y el factor IGF-2, los cuales se encuentran regulados principalmente por los niveles de INS (y ésta a su vez por los de GLU), y su acción es ejercida mediante la interacción con cuatro tipos diferentes de receptores: el receptor para la INS, el receptor para el factor IGF-1 (IGF-1R), el receptor para el factor IGF-2 (IGF-2R) o manosa-6-fosfato y un receptor híbrido para INS/IGF-1 (Igwebuike, 2010; Randhawa y col., 2005; Dupont y col., 2014). La acción de IGF-1 sobre el desarrollo de los órganos reproductivos se logra a través de la activación tanto de IGF-1R como del receptor de Estradiol tipo 1 o ESR1 (Taylor y col., 2001).

Varios estudios han demostrado el efecto detrimental de la desnutrición materna sobre el desarrollo ovárico de las crías (Ying y col., 2013; Hernandez-Medrano y col., 2012; Lea y col., 2006; Rae y col., 2002c, 2001). Sin embargo, todavía no está del todo esclarecido cómo afecta la restricción materna al desarrollo uterino de la descendencia. En los rumiantes, si bien la mayor parte del desarrollo y crecimiento uterino tiene lugar durante la gestación tardía y después del nacimiento, en el endometrio fetal se expresan receptores para los factores de crecimiento tipo insulínicos 1 y 2 (IGF-1 e IGF-2) y el receptor de estrógeno alfa (ESR1) a partir del día 60 de gestación, y se conservan hasta el posparto para estimular el desarrollo del mismo (Taylor y col., 2001). Estos factores están involucrados en la proliferación, diferenciación y función celular mediante mecanismos de acción parácrinos y/o autócrinos en diversos órganos, incluidos ovarios y útero (Nayak y Giudice, 2003). En corderas, el desarrollo glandular uterino comienza entre los 135 y 150

días de gestación (Wiley y col., 1987) y alrededor de los 52-56 días posparto el útero es histológica y estructuralmente similar al del adulto (Taylor y col., 2000).

En la última década se ha visto que los IGF-1 cumplen un papel fundamental en el desarrollo fetal y postnatal de los órganos reproductivos (Nayak y Giudice, 2003). Por ello se hipotetiza que la subnutrición materna durante el tercer tercio de gestación llevará a menores niveles circulantes de GLU y en consecuencia de IGF-1 y esto repercutirá con un retardo en el desarrollo de órganos reproductores en las crías hembras, en particular, del útero. El objetivo de este trabajo es relacionar la restricción alimentaria durante el final de la gestación con la futura performance reproductiva de las crías; evaluando las concentraciones séricas de GLU e IGF-1 desde el nacimiento, determinando la arquitectura histológica del útero y ovarios, y midiendo la expresión génica de IGF1 y sus receptores en los órganos reproductivos.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Animales

Se utilizaron ovejas (N=8) Hampshire Down preñadas de hembras (confirmadas por ecografía con transductor sectorial de 5 MHz) para este experimento; las mismas se encontraban en condiciones de pastoreo presentando similares estados de CC. Alrededor de los días 90 - 100 de gestación las ovejas se reubicaron en corrales individuales y contiguos en galpones de la Cátedra de Nutrición Animal de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC). Luego de un período de acostumbamiento, los animales fueron designados aleatoriamente al grupo control o "C" (n=4); alimentadas diariamente con una dieta en base a heno de alfalfa y maíz al 100% de sus requerimientos de EM según el NRC (1985) o al grupo restringido o "R" (n=4) nutricionalmente; alimentadas al 50% de

los requerimientos de EM según el NRC hasta la finalización de la gestación (144-148 días).

Los animales estaban alojados de tal manera que podían observarse entre ellos, eliminando cualquier estrés causado por aislamiento. En ambos grupos el suministro de agua fue ad libitum durante todo el experimento.

Luego del parto, los corderos se identificaron apropiadamente y se pesaron y junto con las ovejas de ambos grupos se alimentaron con dieta de lactancia, siendo el cambio hacia ésta gradual para no afectar el ambiente ruminal.

3.2.2. Toma de muestras

Para la toma de muestras de sangre, se colectaron muestras de la vena yugular de las ovejas desde el día 0 (confección de grupos C y R) en ambos grupos, y una vez por semana hasta el parto, cuando se tomaron las últimas muestras de sangre de las ovejas. Para las corderas se tomó la primera muestra el día de nacido y luego una vez por semana hasta la eutanasia a los 60 días, donde el desarrollo histológico y estructural de las capas uterinas se ha completado (Carpenter y col., 2003; Wiley y col., 1987).

La sangre se colectó en tubos de vidrio y fueron llevadas inmediatamente al laboratorio para centrifugarlas a 3000 rpm por 15 minutos para la separación del suero, los cuales se congelaron a -20°C hasta su análisis.

Para la toma de muestras de tejidos las corderas se eutanasiaron alrededor de los 60 días de edad. Los úteros de cada cordera se disecaron separándolo del ligamento ancho, oviducto y cérvix. Luego fueron pesados. Los ovarios también se disecaron y pesaron. Uno de los ovarios y una sección de 1 cm³ de la porción media de cada cuerno se colocaron en formalina al 4% a temperatura ambiente para histología. El otro ovario y otra sección del cuerno uterino se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y luego fueron conservados a -80°C hasta que fueron procesados para la extracción de ARN.

3.2.3. Medición de metabolitos sanguíneos

Los niveles de GLU se determinaron in-situ con el dispositivo ACCU-CHEK Performa.

La determinación de IGF1 y E₂ fue realizado por radioinmuno-análisis (RIA) en el laboratorio IBYME (CONICET) a partir de la última muestra sanguínea colectada la semana previa al parto (semana -1) en las madres.

En cuanto a las crías, las mediciones de IGF-1 se hicieron a lo largo de los 50 días de muestreo sanguíneo, y a partir de la última muestra colectada previo al sacrificio se hizo el análisis para E₂.

Para el IGF-1 se hizo una extracción previa con HCl-etanol y crioprecipitación, mientras que el E₂ se extrajo con éter etílico (Lacau-Menjido y col., 2000).

3.2.4. Histología

Se realizaron cortes de los tejidos ováricos y uterino que estaban en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina siguiendo una metodología estándar. La observación microscópica se realizó con un microscopio de luz convencional con cámara fotográfica acoplada.

Para los preparados de ovario, la determinación del diámetro folicular se realizó a través del software Fiji (Schindelin y col., 2012), realizando la medición en todos los folículos que se podían observar enteros en la foto a 4X. Por cada animal, se determinó el diámetro folicular en al menos 4 cortes histológicos. Para los preparados de útero, se realizó el conteo de glándulas endometriales y células glandulares en fotos a 40X con el software Photoimpact. Las glándulas que se contaron eran las que se encontraban en la zona ventral del cuerno uterino, y se consideraban si estaba al menos la mitad de la glándula. El conteo de las células glandulares se realizó tomando 10 glándulas al azar (no se contaron células superpuestas, ni en mitosis).

3.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR)

El ARN mensajero (ARNm) se extrajo de los tejidos uterinos y ováricos usando el reactivo Trizol (Thermo Scientific) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las concentraciones del ARN aislado se determinaron con Nanodrop y posteriormente se llevaron a -80°C hasta su conversión a ADNc. Posterior a su descongelación, se extrajo una alícuota del ARN aislado y se convirtió en ADNc usando la Transcriptasa Reversa M-MLV (Promega) siguiendo la metodología sugerida por el fabricante. El ADNc sintetizado fue luego llevado a freezer (-20°C) hasta el momento de realización de qRT-PCR. Los genes elegidos para las mediciones de ARNm fueron: IGF1, IGF-1R, ESR1, ESR2 y ACTB (β -actina) como control endógeno. Mediante el uso de cebadores o primers (Invitrogen) y SYBR Green PCR Master MIX (Applied Biosystems) se determinó la

expresión relativa de estos genes. Los cebadores fueron diseñados por el software Primer Express de Applied Biosystems, correspondiente al ARNm de *Ovis aries*. El número de acceso y secuencia de los cebadores están reportados en la Tabla 3.1.

Todos los pares de cebadores tuvieron una eficiencia superior al 95%. Todas las muestras fueron procesadas (o corridas) por triplicado para cada gen y β -actina. No hubo diferencias en la expresión de β -actina entre los grupos.

La expresión relativa de ARNm para cada gen fue calculada mediante el cambio de los umbrales en cada ciclo (Δ Ct) entre la media Ct para cada gen y la media Ct para el ARNm de β -actina de la misma muestra.

Tabla 3.1.: Número de acceso y secuencias de los cebadores utilizados para qRT-PCR

Gen	Cebador directo	Cebador Reverso	Núm. de acceso
IGF1	ACATCCTCCTCGCATCTCTTCT	CGTGGCAGAGCTGCTGAA	NM_001009774
IGF-1R	CGCATGTGCTGGCAGTACA	CCTTGACGCTGCTGATGGT	AF025303
ESR1	CCCGGAAGACGTGAATCAGA	GTTTGCAAGGAATGCGATGA	XM_012137956
ESR2	GCTCTGGTCTGGGTGATTGC	TTAGCCAGGCGCATGGA	NM_001009737
ACTB	TCACGGAGCGTGGCTACAG	CCTTGATGTCACGGACGATTT	NM_001009784

3.2.6. Análisis Estadístico

Los resultados de GLU materna y de las hijas, y los niveles de IGF-1 de las hijas fue analizado como medidas repetidas en el tiempo en un modelo mixto utilizando el procedimiento MIXED de SAS (SAS Version 9.2 for Windows, SAS Institute, Cary, NC, USA), considerando al animal como efecto aleatorio. El modelo incluyó el efecto del

grupo materno y la edad y la interacción entre ambos términos. El resto de los resultados fueron analizados por ANOVA, utilizando el procedimiento GLIMMIX de SAS (SAS Version 9.2 for Windows, SAS Institute, Cary, NC, USA) con la oveja tratada como efecto aleatorio. Los datos son expresados como valor medio \pm la DE para cada edad. Los resultados fueron considerados significativos cuando el valor p fue menor a 0.05, mientras que un valor p entre 0,05 y 0,1 fue considerado una tendencia.

3.3. Resultados

3.3.1. Concentraciones sanguíneas de GLU en ovejas

Hubo a una tendencia a menores niveles de GLU en las ovejas del grupo R comparado con las ovejas del grupo C ($p=0,06$). Los niveles de GLU no variaron significativamente con la edad gestacional ($p=0,14$), y no hubo interacción significativa entre el grupo materno y la edad gestacional ($p=0,36$). Para cada edad gestacional, hacia la semana -2 las diferencias entre las concentraciones de GLU sanguínea fueron significativas ($p=0,01$) entre los grupos, mientras que hubo una tendencia a menores valores de GLU en el grupo R en la muestra postparto ($p=0,09$). En el gráfico se aprecia que la curva de GLU para el grupo "Control" fue más estable en el tiempo en comparación con el grupo "Restringido" en el que la curva muestra variaciones más pronunciadas.

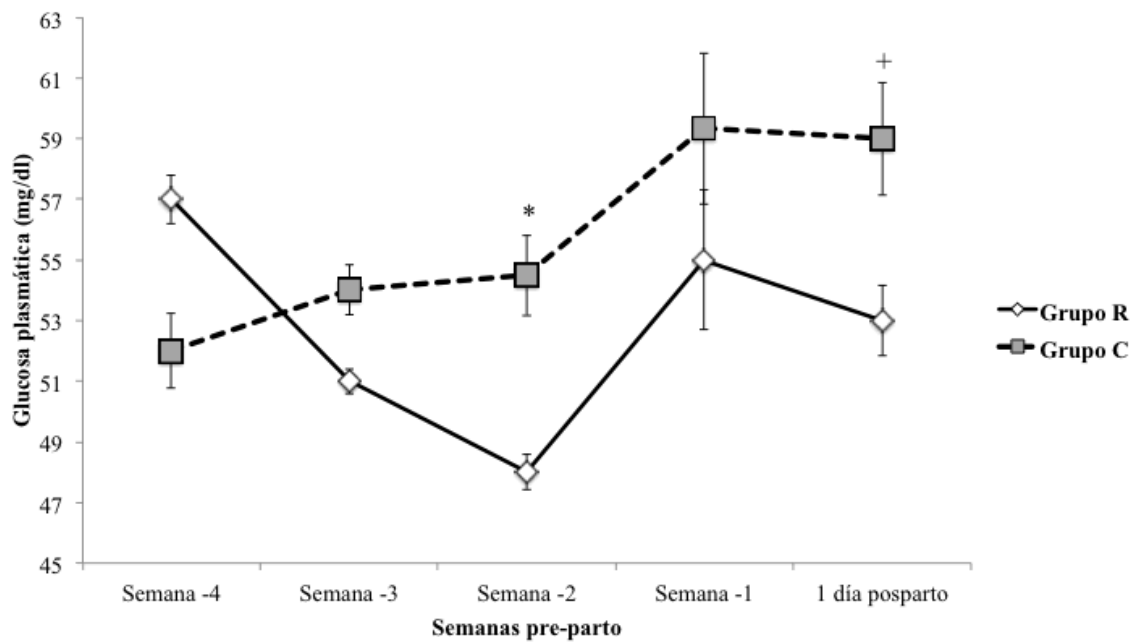


Figura 3.1.: Niveles promedio de glucosa sanguínea en ovejas preñadas alimentadas al 100% (Controles o “C”) o al 50% (Restringidas o “R”) de los requerimientos durante el último mes de gestación (*p=0,01; +p=0,09).

3.3.2. Concentraciones sanguíneas de IGF-1 en ovejas

A partir de una única muestra obtenida la semana previa al parto (semana -1) se realizó la medición sérica de IGF-1 en las madres, arrojando valores para el grupo de ovejas Controles de $153,22 \pm 56,37$ y en Restringidas de $93,06 \pm 18,98$ ng/ml. No hubo diferencias significativas entre los grupos, pero sí una tendencia a menor valor para este último grupo ($p=0,08$).

3.3.3. Concentraciones sanguíneas de E₂ en ovejas

A partir de una única muestra obtenida la semana previa al parto (semana -1) se realizó la

medición sérica de E₂ en las madres. A pesar de la aparente diferencia expuesta en el gráfico no hubo diferencias significativas entre los grupos. La mediana (ME) entre ambos grupos no difieren (Figura 3.2.).

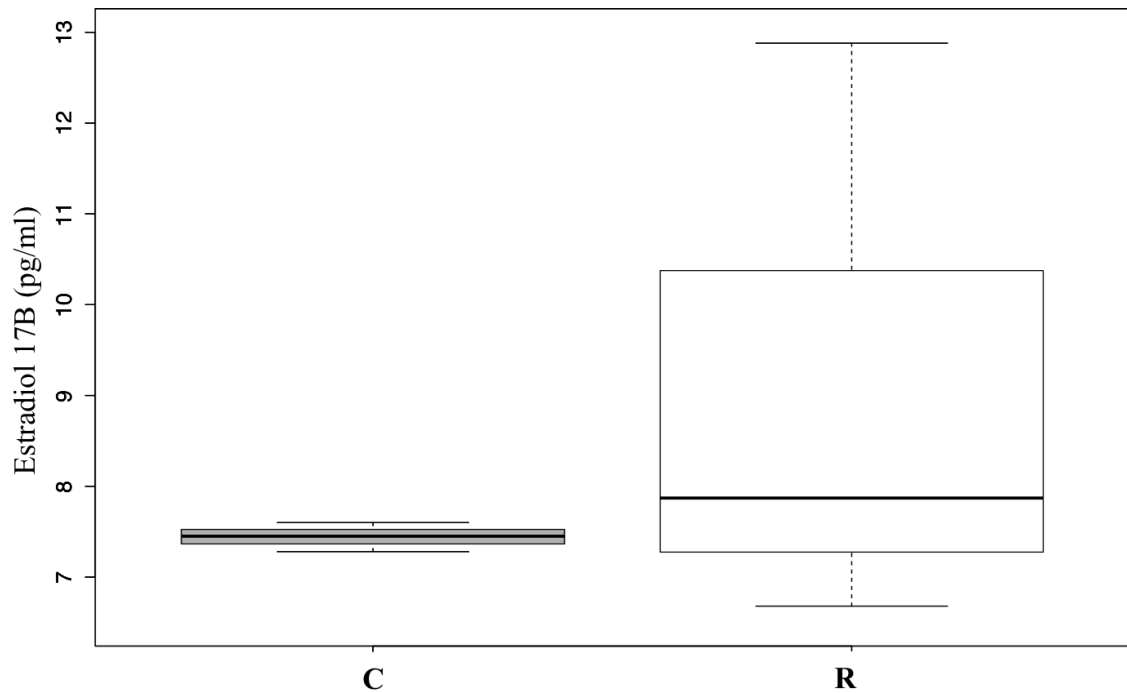


Figura 3.2.: concentraciones sanguíneas de estradiol durante la semana previa al parto de ovejas alimentadas al 100% (Controles o "C") o al 50% (Restringidas o "R") de los requerimientos durante el último tercio de la gestación. No hubo diferencias significativas entre los grupos.

3.3.4. Concentraciones sanguíneas de GLU en corderas

No hubo diferencias significativas en los niveles de GLU entre las corderas nacidas del grupo "C" o "R" durante los primeros 2 meses de vida ($p=0,12$). Sin embargo, el efecto de la edad fue significativo ($p<0,0001$), y la interacción entre ambos términos también ($p=0,04$), por lo que el efecto del grupo materno sobre los niveles de GLU en las corderas

dependió de la edad. Las corderas nacidas de las ovejas en el grupo "R" presentaron niveles significativamente menores de GLU las primeras 24 - 48 hrs posparto en relación a los niveles en corderas nacidas de ovejas en el grupo "C" ($p=0,0002$) (Figura 3.3.). A partir de la primera semana de vida los valores fueron similares entre los grupos, con mayores valores numéricos de glucemia a favor de las corderas nacidas del grupo "C". A partir del mes de vida y hasta la finalización del estudio, las concentraciones de GLU sanguínea fueron similares entre las corderas nacidas de las ovejas en ambos grupos de estudio.

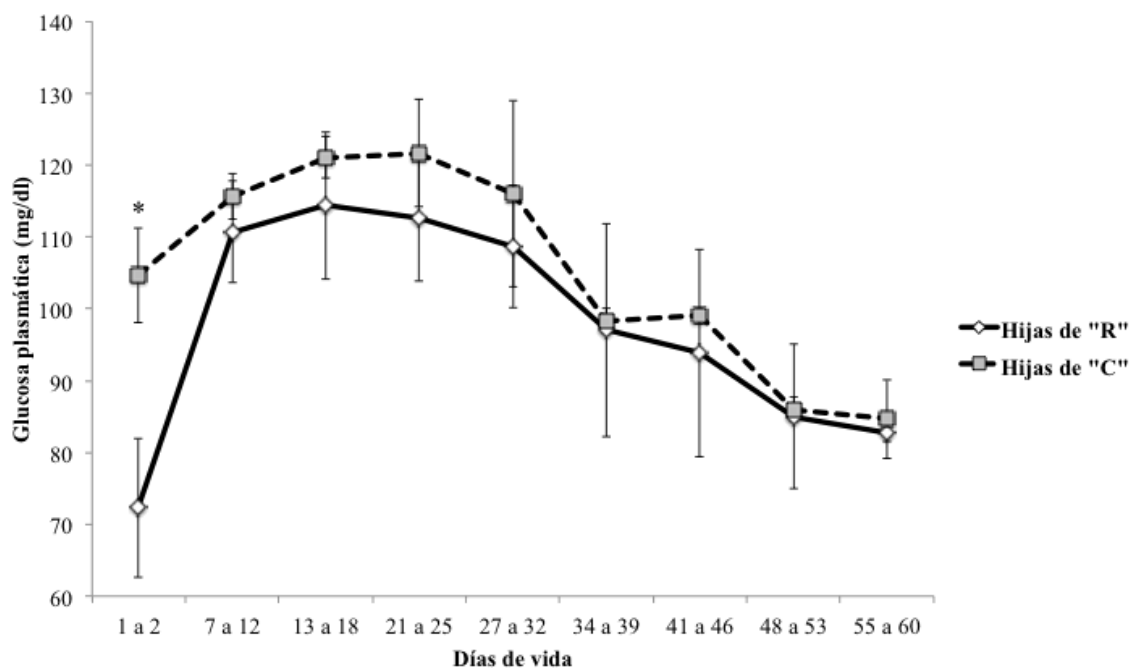


Figura 3.3.: Niveles promedio de glucosa sanguínea en corderas nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el 3/3 de gestación (Restrictivas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C") (* $p<0,05$).

3.3.5. Concentraciones sanguíneas de IGF-1 en corderas

El efecto del nivel nutricional materno tendió a afectar los niveles de IGF-1 en las corderas durante los primeros 40 días de vida ($p=0,058$). Los niveles de IGF-1 variaron significativamente debido a la edad ($p=0,0016$) y la interacción entre edad y grupo materno fue significativo ($p=0,005$). Como puede observarse en la figura 3.4., las medias de las concentraciones plasmáticas de IGF-1 en las corderas nacidas de las madres en ambos grupos difirieron significativamente a edades determinadas. Durante las primeras 48 horas, los valores de IGF-1 para las corderas nacidas de las madres en el grupo "R" fueron significativamente muy inferiores (menores al doble) comparado con las corderas nacidas de las madres en el grupo "C" ($p=0,0003$). La diferencia también fue significativa entre la primera y segunda semana de vida ($p=0,04$), Alrededor del día 25 posparto los valores no mostraron diferencias entre las corderas nacidas de las ovejas en ambos grupos.

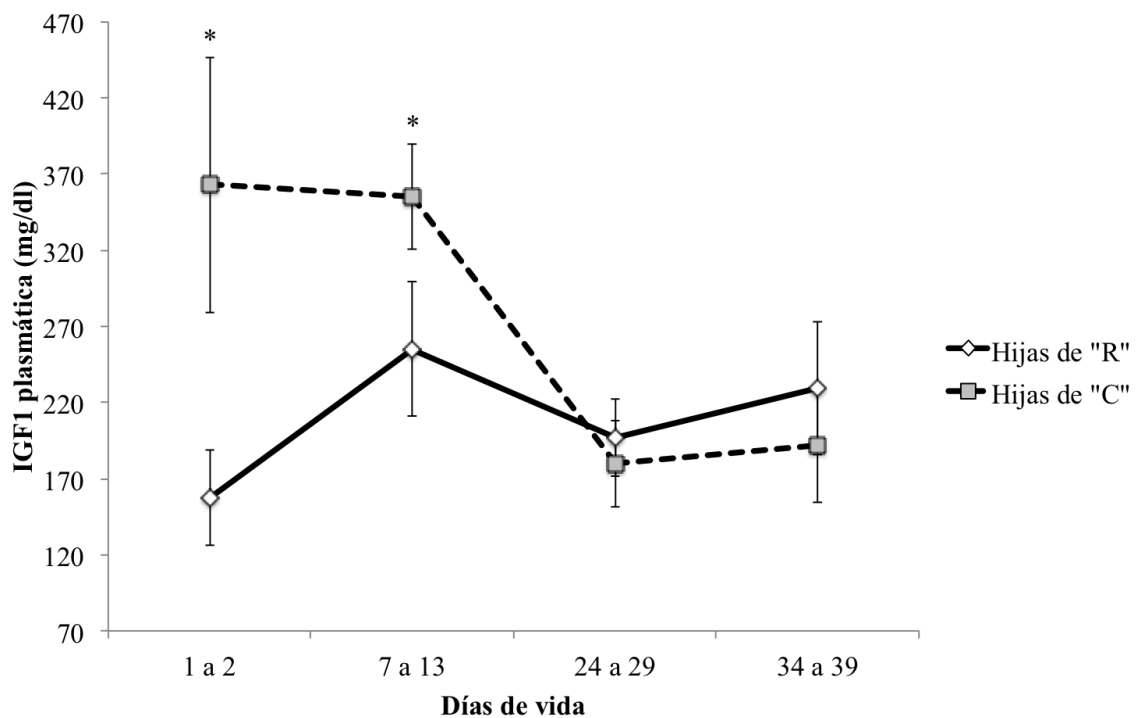


Figura 3.4.: Niveles promedio de IGF-1 sanguíneos en corderas nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el 2/3 de gestación (Restringidas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C") (* $p<0,05$).

3.3.6. Concentraciones sanguíneas de E₂ en corderas

A partir de una única muestra colectada a los 50 días de vida (alrededor de una semana previo al sacrificio) se realizó la medición de E₂ sanguíneo en las corderas. En el siguiente gráfico de cajas (box-plot) puede apreciarse una clara diferencia entre los grupos, estando fuertemente disminuida la producción de E₂ en el grupo de corderas nacidas de las ovejas en el grupo "R" con diferencias significativas ($p=0,04$). Las ME entre los grupos difieren significativamente, con valores menores al doble para las corderas hijas de las ovejas en el grupo "R" comparado con las hijas de las ovejas en el grupo "C" (Figura 3.5.).

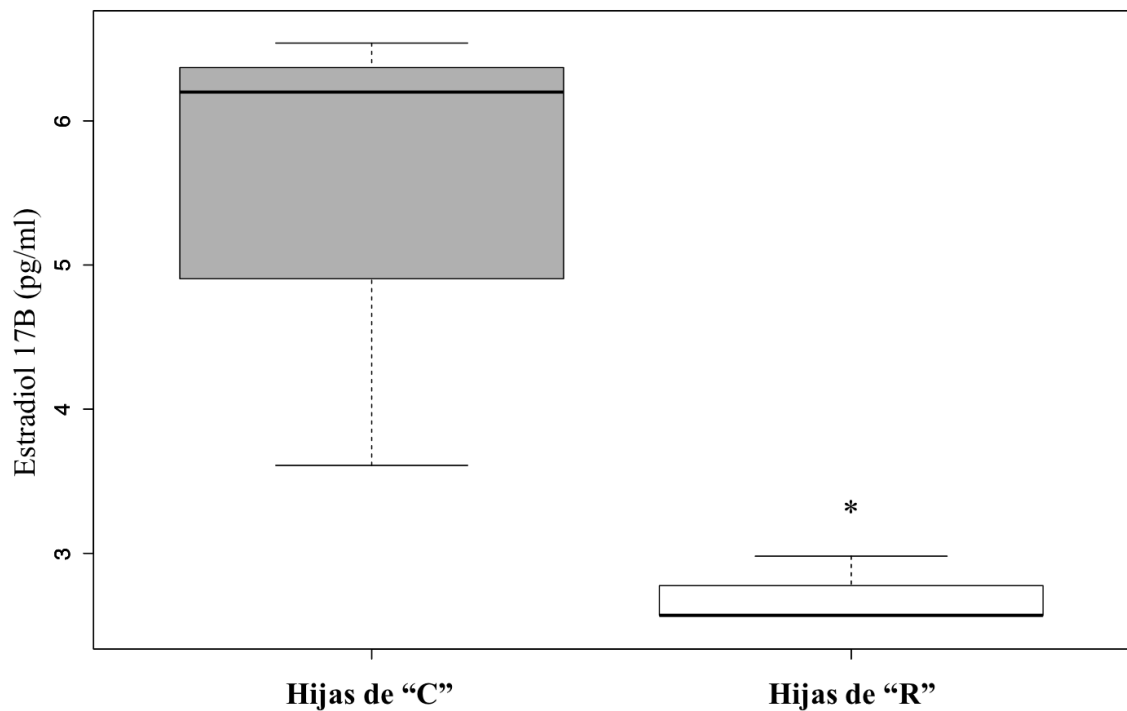


Figura 3.5.: Concentraciones sanguíneas de estradiol obtenidas a los 50 días de vida de corderas nacidas de madres alimentadas al 100% (Controles o "C") o al 50% (Restringidas o "R") durante el último tercio de gestación. (* $p=0,04$).

3.3.7. Expresión de ARNm para IGF-1 y su receptor (IGF-1R) a los 60 días de vida

A nivel uterino, el único gen significativamente inhibido por la restricción alimenticia materna durante el tercer tercio de la gestación es el IGF-1R ($p < 0,05$), mientras que hubo una tendencia a una menor expresión de IGF-1 ($p = 0,1$). Para el caso del gen para ESR1 la gran variabilidad de las muestras hizo que la diferencia observada en la figura no sea significativa. La expresión para ESR2 no mostró relación con los niveles de alimentación materna (Figura 3.6.).

A nivel ovárico hubo una diferencia significativa en la expresión génica de IGF-1 entre las corderas nacidas de ambos grupos ($p < 0,05$) y una tendencia a menor expresión del gen para IGF-1R ($p = 0,08$). Para el caso de los genes de estradiol, la expresión de ESR1 y ESR2 no presentaron diferencias entre los grupos en este estudio (Figura 3.7.).

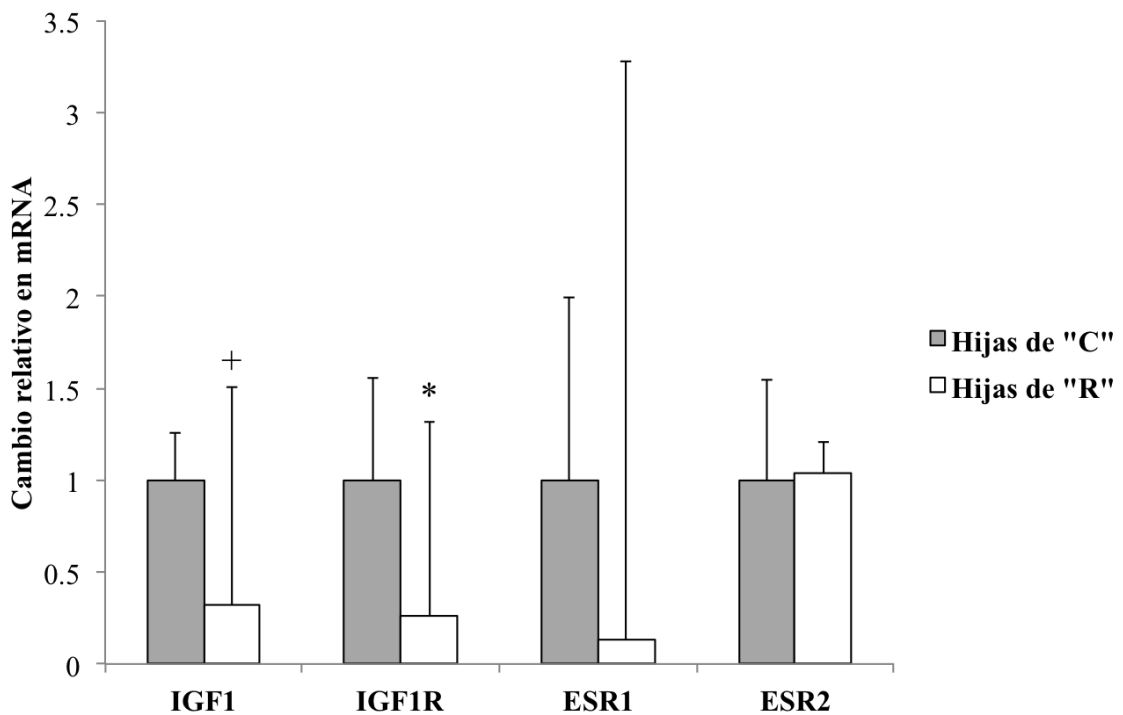


Figura 3.6.: Expresión génica en el útero para el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), receptor uterino del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R), receptor uterino para Estradiol 1 (ESR1) y 2 (ESR2) en corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el 3/3 de gestación (Restringidas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C") (*p<0,05; +p<0,1).

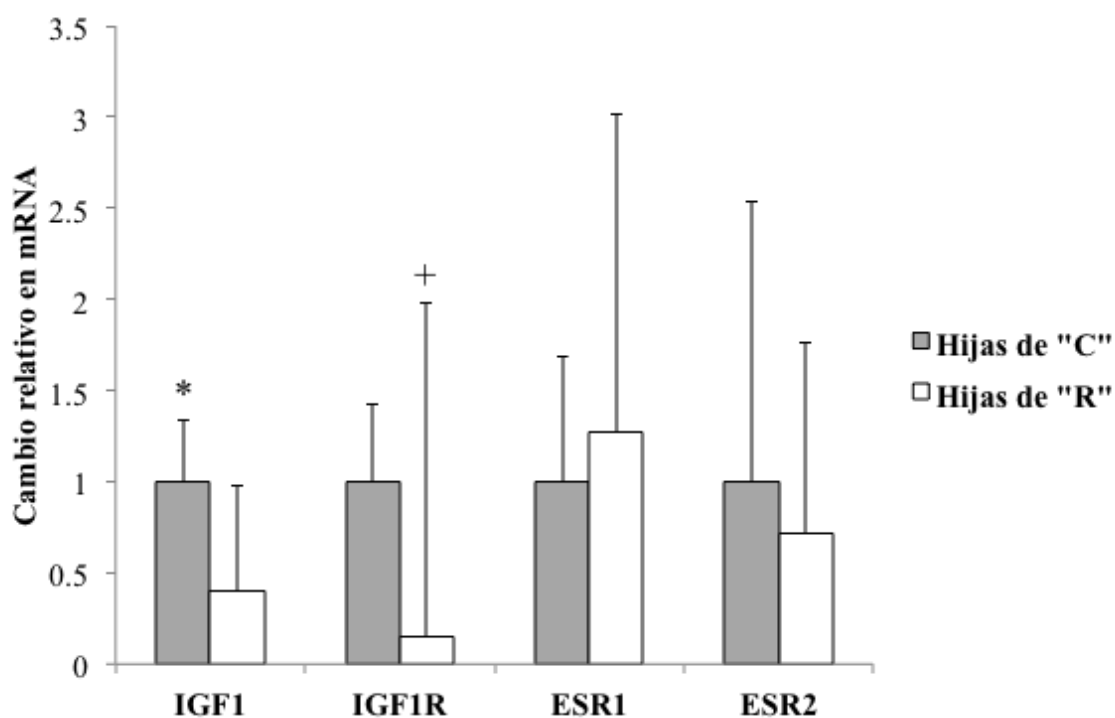


Figura 3.7.: Expresión génica en el ovario para el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), receptor ovárico del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R), receptor ovárico para Estradiol 1 (ESR1) y 2 (ESR2) en corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el 3/3 de gestación (Restringidas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C") (*p<0,05; +p<0,1).

3.3.8. Peso de los órganos reproductivos a los 60 días de vida

No hubo diferencias en el peso de los ovarios entre las corderas nacidas de las ovejas en ambos grupos, posiblemente debido al hecho de que el desarrollo de las gónadas se da en la gestación temprana, estando fuera del período de tiempo de restricción nutricional de este estudio.

En cuanto al útero, hubo una severa disminución del peso del órgano de las corderas nacidas de las ovejas en grupo "R", comparado con el peso de los úteros de las corderas nacidas de las ovejas en el grupo "C" ($p < 0,05$) (Tabla 3.2.).

Tabla 3.2. Peso promedio (gramos) de los órganos reproductivos en corderas nacidas de madres restringidas nutricionalmente al final de la gestación o controles. Letras diferentes indican diferencia significativa para cada órgano ($p < 0,05$).

Condición materna	Ovarios		Útero	
	Peso promedio	Desviación estándar	Peso promedio	Desviación estándar
Controles	0,53	0,25	4,86 ^A	1,52
Restringidas	0,60	0,36	2,83 ^B	1,61

3.3.9. Histología ovárica

El diámetro de los folículos secundarios y terciarios que se encontraron en los cortes histológicos de ovarios fue significativamente menor para las corderas nacidas de las madres en el grupo R (Figura 3.8.A, $p = 0,006$) hacia los 60 días de vida, como puede observarse en las fotos de los cortes histológicos (Figura 3.8.B.).

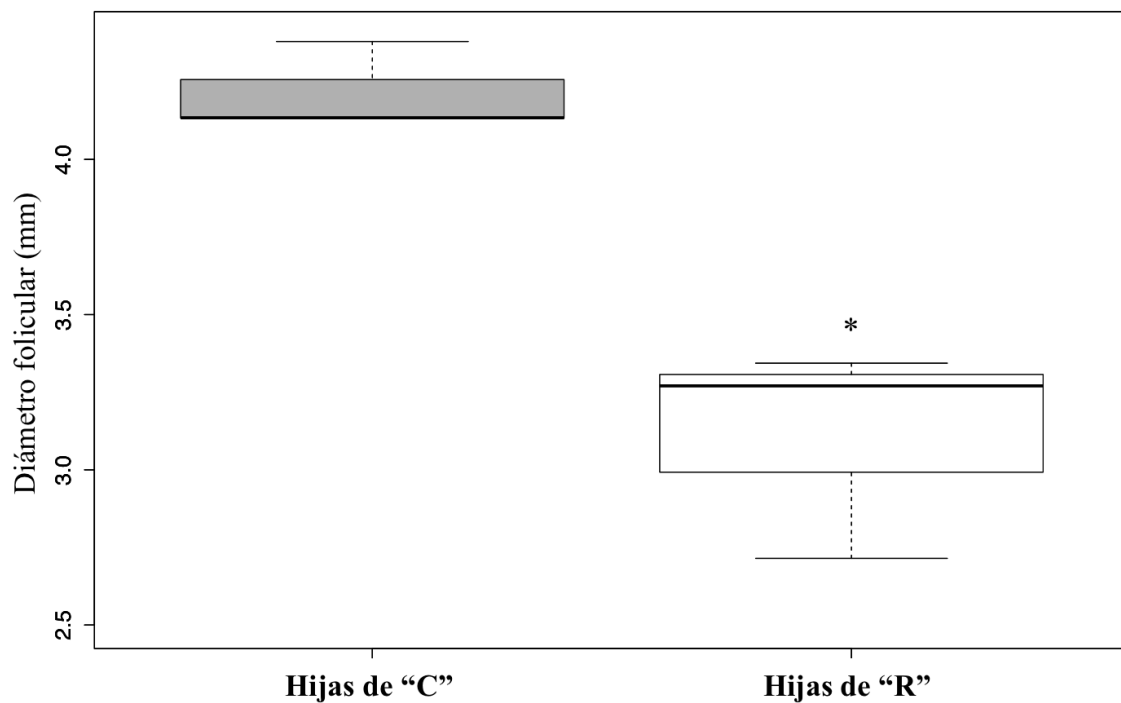


Figura 3.8.A.: Diámetros promedio de folículos (secundarios y terciarios) ováricos en corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el 3/3 de gestación (Restringsidas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C") (* p=0,006).

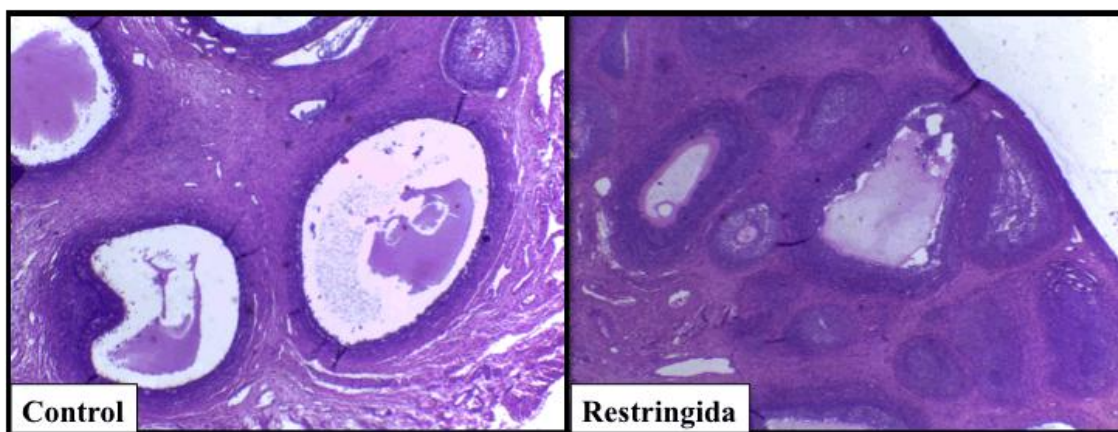


Figura 3.8.B.: Imágenes de cortes histológicos de ovario captadas por el Software Fiji a un aumento de 4X de corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el 3/3 de gestación (Restringidas) o alimentadas al 100% (Controles).

3.3.10. Histología uterina

El número de glándulas endometriales en los cortes histológicos de útero también fue significativamente menor para las corderas nacidas de las madres en el grupo “R” comparado con las corderas nacidas de las madres en el grupo “C” ($p=0,02$; Figura 3.9.A.-B.). No hubo diferencias en el número de células por glándula endometrial (22.3 y 26 células para las corderas nacidas de las ovejas en los grupos "C" y "R", respectivamente).

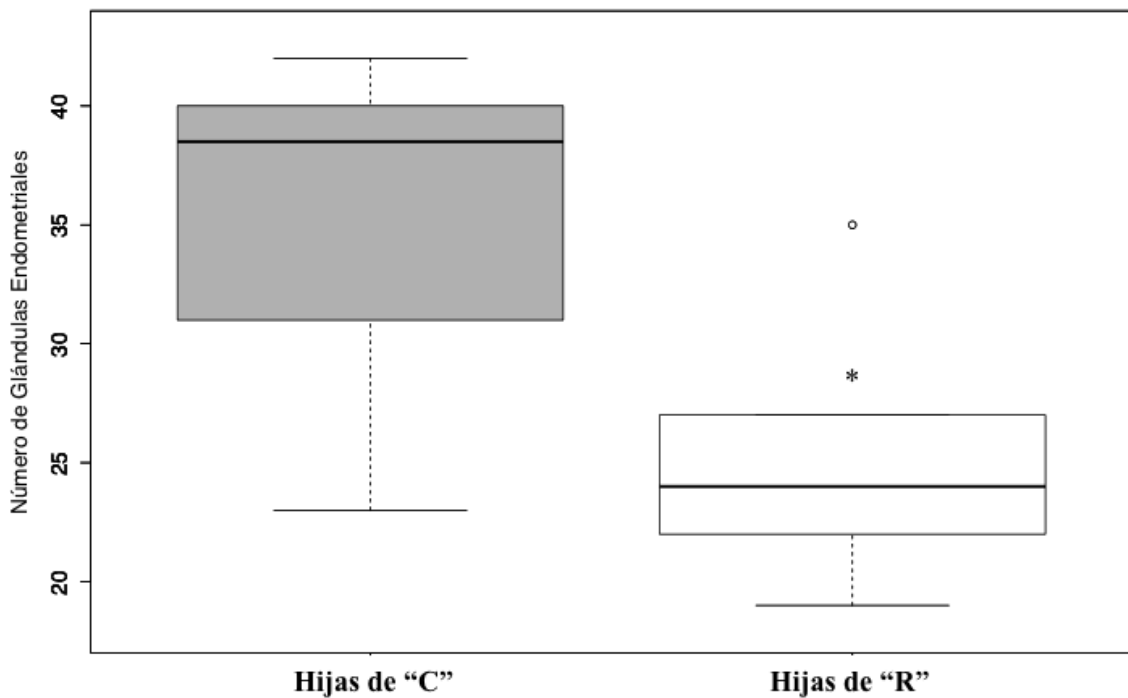


Figura 3.9.A.: Número promedio de glándulas endometriales en corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el 3/3 de gestación (Restringidas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C") (*p=0,02).

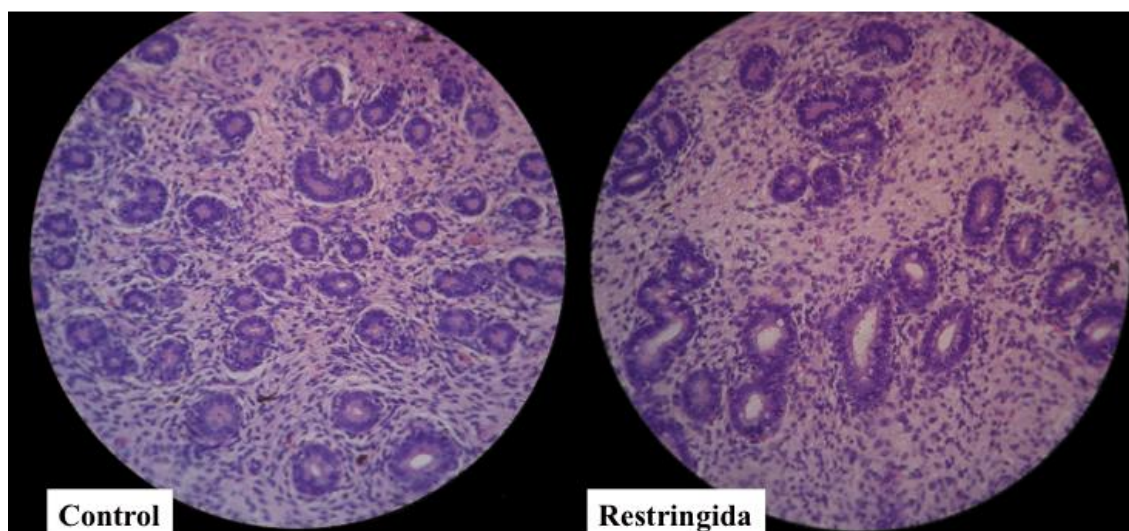


Figura 3.9.B.: Imágenes de cortes histológicos de úteros captadas por el Software PhotoImpact a un aumento de 40X de corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el 3/3 de gestación (Restringidas) o alimentadas al 100% (Controles).

3.4. Discusión

Las restricciones nutricionales en ovejas gestantes pueden tener muchos y diversos impactos tanto en etapas previas a la concepción como en etapas embriológicas y fetales. En gestaciones avanzadas, los efectos de la desnutrición se ven exacerbados debido al crecimiento del 75% de masa fetal y la gran demanda de nutrientes durante el último tercio de la preñez, ocasionando no solo perturbaciones en el desarrollo fetal sino también un importante número de enfermedades que se manifestarán en la vida adulta, como la resistencia a la INS y síndrome metabólico (Gao y col., 2015).

3.4.1. Glucosa

Las concentraciones plasmáticas de GLU reflejan los niveles de absorción, homeostasis metabólica y niveles de energía corporal (Su y col., 2013).

Los resultados reportados por Gao y col. (2015) y Lekatz y col. (2011) señalan que las concentraciones de GLU sanguínea se ven afectadas en ovejas con gestaciones avanzadas al igual que sus crías al nacimiento. En nuestro estudio, las madres mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos hacia la segunda semana pre parto y una tendencia a menores valores en las ovejas en grupo "R" (Figura 3.1). Para el caso de las crías, los menores niveles de GLU ($p < 0,05$) en el grupo de corderas "Restringidas" se manifestaron únicamente los primeros días posparto (Figura 3.3). Esto sugeriría por un lado, que el BEN de las madres del grupo "R" pudo ser más profundo y/o prolongado de lo reportado, debido a que en rumiantes puede ser más complicado observar grandes diferencias en las concentraciones de GLU sanguínea, las cuales tienden a ser muy estables en condiciones normales, y por otro lado, que el BEN materno repercutió en los niveles de GLU disponibles ocasionando un BEN fetal durante el último tercio de gestación o en algún momento de ella, con posible impacto en el desarrollo y crecimiento de órganos reproductivos fetales.

En relación a lo anteriormente mencionado, Oliver y col. (1993) reportaron, mediante cateterización de fetos, una caída de los niveles de GLU e INS fetales y maternos, después de 48 hrs de restricción total de alimento en ovejas con preñeces avanzadas. Para períodos de desnutrición más amplios (2/3 y 3/3) se mantuvo el patrón de caída en forma paralela de la GLU e INS en madres y fetos hacia las últimas semanas de gestación (Quigley y col., 2008; Osgerby y col., 2002). Además, se ha observado que la desnutrición de ovejas durante gestaciones avanzadas tiene un fuerte impacto en la homeostasis de la GLU en las crías postnacimiento con resistencia a la INS en tejidos que se desarrollan durante este período de tiempo intrauterino, como el caso de los músculos

esqueléticos y tejido adiposo (Gardner y col., 2005). Parecería que en nuestro experimento y una vez superado los primeros días de vida, los niveles de GLU en las crías (de ambos grupos) no están alterados y en cuanto las corderas desarrollan sus hábitos alimenticios, las curvas de GLU se comportan de igual forma, al menos durante los 60 días posparto (Figura 3.3.).

Si bien el mecanismo por el cual la restricción nutricional afecta el desarrollo fetal no es del todo conocido (Gao y col., 2015), el más aceptado es el siguiente: las ovejas en período gestacional y bajo condiciones de restricciones nutricionales entran en un período de BEN y producto de las menores concentraciones sanguíneas de GLU materna, el feto también desarrolla BEN. A modo de minimizar sus efectos, se desencadenan en la madre una serie de mecanismos adaptativos, comandados por el sistema endócrino, que modifican el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos (Gao y col., 2015). Se exagera la gluconeogénesis en el hígado (fuentes alternas para la obtención del GLU y cuyo sustrato energético es la GLU) y rápidamente se incrementa la lipólisis apareciendo en circulación concentraciones cada vez mayores de ácidos grasos no esterificados (AGNEs) y β -hidroxibutirato (BHB), los cuales son indicadores de movilización lipídica (con pérdida de peso corporal), mayor BEN, cetosis e hígado graso (Zhang y Tan, 2007). A medida que la restricción nutricional progresa, podrían desencadenarse fallas en el metabolismo hepático que pondrían en riesgo incluso hasta la vida del animal. El feto durante los últimos 2 meses de gestación alcanza entre el 80-85% de su peso final (Robinson y col., 1999; Symonds y col., 2001), por lo que podrían desencadenarse alteraciones permanentes en órganos o sistemas de órganos que alteren su metabolismo postnacimiento y que puedan expresarse durante la vida adulta del individuo (Gao y col., 2015; Micke y col., 2010; Osgerby y col., 2002; Symonds y col., 2001).

3.4.2. IFG-1 e IGF-1R

Estas proteínas son altamente dependiente de las concentraciones de nutrientes, en especial de GLU y forman parte del eje de crecimiento, junto con la hormona de crecimiento (GH) (Hoffman y col., 2014) cumpliendo funciones muy importantes en el crecimiento y desarrollo embrionario, fetal y postnatal (Igwebuike, 2010). Los IGFs y sus receptores intervienen en la regulación del desarrollo, diferenciación y función endometrial, lo cual resulta fundamental en los ovinos ya que hasta el día 56 posparto hay un importante desarrollo del útero en las crías (Carpenter y col., 2003).

Las ovejas preñadas bajo balance energético negativo (BEN) han sido relacionadas con cuadros de hipoglucemia y hipoinsulinemia y consecuentemente menores niveles sanguíneos de IGF-1 (Scaramuzzi y col., 2006; Oliver y col., 1993). En nuestro estudio los niveles maternos de IGF-1 mostraron una tendencia a menor valor ($p=0,08$) para el grupo de ovejas "R" a partir de la muestra previa al parto. Distinto fue el caso para sus hijas, cuyos niveles estuvieron muy deprimidos las primeras 2 semanas de vida (Figura 3.4.), con diferencias significativas ($p<0,05$) respecto del grupo control. Osgerby (y col., 2002) y Oliver (y col., 1993) restringieron ovejas con gestaciones avanzadas y mediante cateterización de los fetos relacionaron el BEN inducido en las madres con el consecuente BEN, hipoglucemia y menores niveles de IGF1 fetales (Scaramuzzi y col., 2006). En base a los experimentos citados anteriormente y a nuestros resultados, es posible especular que a partir del BEN materno y niveles alterados de IGF-1 en el grupo "R", se desarrolle un BEN fetal que deprima los niveles de IGF-1 durante la vida intrauterina, justificando al posparto los muy bajos valores sanguíneos de GLU e IGF-1 entre los días 1 y 2 de nacimiento (Figura 3.3.) y las primeras semanas (Figura 3.4.), respectivamente.

Similar a nuestros resultados, se ha observado que corderos nacidos de madres bajo subnutrición desde el día 116 al parto, presentaron niveles circulantes significativamente menores de IGF-1 pero sin diferencias significativas entre las concentraciones de GLU (Hoffman y col., 2014).

Además de la menor producción de IGF-1, la expresión génica de IGF-1 y su receptor tendieron o estuvieron significativamente disminuidas a nivel ovárico (Figura 3.7.) y uterino (Figura 3.6.), respectivamente, en las crías nacidas de las ovejas del grupo "R" hacia los 60 días de vida. Debido a la gran importancia que el IGF-1 tiene sobre el desarrollo uterino durante la gestación tardía y posparto temprano, puede observarse en Tabla 2 las diferencias significativas de peso ($p < 0,05$) de los úteros de las corderas al sacrificio entre ambos grupos, similar a lo reportado por Taylor y col. (2001), en donde manifiestan que el IGF-1R es la vía por medio del cual los niveles de IGF-1 promueven el desarrollo uterino posnacimiento en ovinos. Es de suma importancia recordar que las crías nacen con úteros inmaduros y que el principal desarrollo histológico de los mismos tiene lugar desde la primer semana de vida, con la formación de las glándulas uterinas, hasta los 56 días posparto donde se completaría la morfogénesis uterina, con claras separaciones entre las zonas intercarunculares o glandulares y las zonas carunculares o aglandulares, característicos en los úteros adultos (Carpenter y col., 2003; Wiley y col., 1987).

A nivel ovárico, se ha reportado en ovejas y otros rumiantes, la expresión de ARNm para el receptor IGF-1R tanto en las células de la granulosa como en las células tecales de folículos antrales (Dupont y col., 2014); los cuales se vieron afectados ante diferentes tratamientos nutricionales, sugiriendo que la nutrición de la hembra podría afectar las acciones del sistema IGF sobre la foliculogénesis (Muñoz-Gutiérrez y col., 2004). En nuestro estudio, las expresiones génicas ováricas para IGF1 e IGF-1R estuvieron significativamente disminuidas para el primero, con una tendencia a menor valor para su receptor (Figura 3.7.). Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre el peso de los ovarios entre los grupos de estudio (Tabla 3.2.) debido, en principio, a que el desarrollo ovárico en pequeños rumiantes tiene lugar entre los 55-60 días de gestación (Eckery y col., 1996). A pesar de esta premisa, hay evidencia superpuesta en la que se ha reportado disminución de masa total ovárica en hijas de ovejas subnutridas en algún momento de la primera mitad de la gestación (Rae y col., 2001, 2002c; Osgerby y col., 2002) y en la que no se ha visto efecto alguno sobre las mismas (Kotsampasi, 2009). Sin embargo, sí coincidieron en que el patrón de crecimiento folicular fue alterado por el régimen alimenticio comparado con el grupo de referencia.

3.4.3. E₂ y sus receptores (ESR1 y ESR2)

La producción de E₂ comienza durante la vida intrauterina y hacia el tercer tercio de gestación juegan un rol importante en la comunicación endócrina con el eje hipotálamo-hipófisis, completamente desarrollado y funcional (Da Silva y col., 2002). Son los folículos ováricos los encargados de la síntesis de E₂ que parecen jugar un rol importante mediando las acciones de IGF-1 sobre sus órganos blanco, entre ellos útero y ovarios (Taylor y col., 2001).

Para el caso de las madres, en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de E₂ sanguíneos entre los grupos de estudio que fueran atribuibles a la restricción alimenticia impuesta el último tercio de la gestación (Figura 3.2.).

Taylor y col. (2000, 2001) reportaron elevados niveles de ESR1 en distintas capas de tejido uterino ovino en animales con pocos días de vida. Allí observaron que las concentraciones de E₂ aumentan entre el primer y los 28 días de vida neonatal y a través del ESR1 se incrementa la producción de IGF-1. Esto es apreciable en las crías nacidas de las ovejas del grupo "C" de nuestros resultados, con niveles de IGF-1 elevados hasta mediados de la cuarta semana (Figura 3.4.) en concordancia con mayores niveles de expresión génica de IGF-1R y ESR1 a nivel uterino (Figura 3.6.) y, en consecuencia, mayor desarrollo y peso del órgano hacia los 60 días (Tabla 3.2.). En cuanto a las corderas nacidas de las madres del grupo "R", los menores niveles sanguíneos de E₂ (Figura 3.5.) e IGF-1 y menores expresiones génicas para su receptor y el de ESR1 uterinos (Figura 3.6.) explicarían úteros con falta de desarrollo y un 30-40% menores y más livianos respecto a las nacidas del grupo "C" (Tabla 3.2.). Estos resultados son similares a los de Baker y col. (1996), donde reportaron úteros 25-30% menores del tamaño normal en ratas de 3-4 meses de edad con ablación de ESR uterino.

A pesar de las ventajas reportadas del ESR1 sobre el crecimiento glandular endometrial (Taylor y col., 2000), para Carpenter y col. (2003), el desarrollo glandular uterino es un proceso independiente de las concentraciones de estrógeno circulante en corderas (ratas y cerdas) desde el nacimiento hasta los 56 días de vida.

Las acciones del ESR1 son más conocidas que las de ESR2, las cuales todavía son bastante elusivas y controversiales entre investigadores. En ratones se ha reportado por un lado que el ESR2 podría tener una función biológica diferente al ESR1 in vivo e in vitro (Mueller y col., 2004) y por otro lado, que sus ubicaciones tisulares no son idénticas a las del ESR1 (Krege y col., 1998). Evidencias más actuales sugieren que a nivel central el ESR2 sería importante revirtiendo posibles efectos deletéreos ante la ausencia del ESR1 (gen ESR1 KO a nivel hipofisiario) en ratones gestantes (Sánchez-Criado y col., 2012). Durante la vida intrauterina, en folículos pequeños y recientemente formados hay un predominio de ESR2 mientras que la expresión para el ESR1 no fue observada (Juenguel y col., 2006). Mientras que varios investigadores han coincidido en el que la expresión génica para ESR2 se encuentra presente desde estadios foliculares tempranos (Juengel y col., 2006) hasta antrales (Cardenas y col., 2001; Jansen y col., 2001), la presencia del ESR1 sufre una estimulación desde estadios pre-antrales tardíos a antrales durante las ondas foliculares en el ovino (Tomanek y col., 1997; Juengel y col., 2006), bovino (Alfaro y col., 2011) y roedores (Dupont y col., 2000).

Sin embargo, la importancia biológica del aumento de la isoforma 2 del ESR es desconocida, como también lo son sus funciones en el tracto reproductor de la hembra (Al Naib y col., 2016).

Algunos reportes indican que la influencia del E₂ sobre los órganos blanco es modulada por las concentraciones de hormonas tisulares y por la ubicación de sus receptores ESR1 y ESR2. Asimismo, aseguran que habría distintos roles para ambos

receptores; el ESR1 estimulado en primera instancia por los niveles de Progesterona (P4) mientras el ESR2 se vería enriquecido solo por las concentraciones de Estrógeno (Shimizu y col., 2010). En ovejas preñadas los niveles de P4 estimularían expresiones génicas para ESR1 a nivel de cérvix uterino y las concentraciones de E₂ solo harían lo mismo posterior a la sensibilización o priming de P4. También se han reportado similares observaciones en úteros bovinos. De cualquier manera, la interacción P4/E₂ en el endometrio parece ser específica para el ESR1 (Shimizu y col., 2010).

En el ovino, las hormonas esteroideas tienen el potencial de regular varios aspectos de la función ovárica desde su desarrollo prenatal, siendo determinantes en la formación de folículos ováricos hasta el reclutamiento y crecimiento temprano de los mismos en cada onda folicular (Juengel y col., 2006). En el presente trabajo, la función endócrina de los ovarios se vio afectada en las crías, considerando que los niveles de E₂ sanguíneos en las corderas nacidas de las ovejas del grupo "R" estuvieron fuertemente deprimidos (Figura 3.5.).

En cuanto a la expresión génica de receptores para E₂ en los ovarios, como puede observarse (Figura 3.7.), no hubo diferencia entre los grupos estudiados que pueda atribuirse a la restricción alimenticia implementada en sus madres. Si bien el máximo desarrollo de los ovarios tiene lugar hacia los 55-60 días de vida intrauterina, durante los primeros dos meses de vida hay crecimiento continuo de folículos que lleva a incrementos de la masa ovárica en las corderas recién nacidas (Carpenter y col., 2003). Esto podría sustentar nuestra hipótesis de disfunción ovárica en las corderas nacidas de ovejas en el grupo "R".

3.4.4. Histologías ováricas y uterinas

Algunos de los primeros reportes sobre la importancia de IGF-1 en los órganos reproductivos se dieron en ratas, donde observaron que la ablación total (mediante mutación) del gen IGF-1 producía descendencia con falta de crecimiento e infértiles, producto de un aparato reproductor subdesarrollado tanto en machos como en hembras. Allí observaron que los ovarios del grupo mutante presentaron ovarios más pequeños con alteración en la esteroidogénesis y niveles de E₂ muy deprimidos, úteros flácidos y con falta de desarrollo (Baker y col., 1996).

A nivel ovárico, en nuestro experimento observamos que los diámetros foliculares de las corderas nacidas de ovejas en el grupo "R" fueron significativamente menores ($p=0,006$) respecto a las nacidas del grupo "C" (Figura 3.9.). En ratas se observó que ante la ausencia total de IGF-1 los folículos rara vez superaban los estadios primarios y secundarios (Baker y col., 1996). Los menores niveles sanguíneos de IGF-1 reportados en las corderas hijas de ovejas en el grupo "R" (Figura 3.4.) y la tendencia a menor valor para su receptor a nivel ovárico (Figura 3.7.) explicarían lo visto en la histopatología: debido a que el IGF-1 es un fuerte precursor de la mitosis en las células de la granulosa, aumentando el número de receptores para hormonas gonadotróficas, en especial FSH (hormona folículo estimulante) y en consecuencia, regulando el crecimiento folicular y la producción de hormonas esteroideas (Toori y col., 2014; Rivas López y col., 2011). Las menores concentraciones sanguíneas de E₂ observadas previo al sacrificio serían un claro indicio de disfunción ovárica y menores diámetros foliculares (Figura 3.5.).

En íntima relación con los resultados anteriores, observamos diferencias significativas ($p=0,02$) entre los grupos respecto al número de glándulas endometriales (Figura 3.10.). Los menores niveles de IGF-1 e IGF-1R (Figura 3.6.), la disfunción ovárica y menores concentraciones séricas de E₂ (Figura 3.5.) explicarían el menor desarrollo glandular uterino y respaldarían los menores pesos registrados para los úteros en las corderas nacidas de ovejas en el grupo "R" (Tabla 3.2.). Con similares resultados, Baker y col. (1996) reportaron que los úteros de ratas no superaban el 15% del tamaño adulto y el componente glandular estuvo fuertemente afectado ante la ausencia total de IGF-1.

Los IGF-1, además de sus propiedades mitóticas y anabólicas, cumplen funciones muy importantes regulando la respuesta a hormonas esteroideas a niveles tisulares en un sinnúmero de tejidos (Igwebuike, 2010; Taylor y col., 2001), es por ello que a pesar de no encontrar diferencias en la expresión génica para ESR1 y ESR2 en ovarios ni úteros entre los grupos, sí se afectaron los niveles sanguíneos de IGF-1, así como los niveles de expresión génica para IGF-1R a nivel ovárico y uterino. El menor desarrollo folicular afectaría el desarrollo uterino postparto, debido entre otras cosas, a menores niveles séricos de IGF-1 y E₂, los cuales resultan claves durante los primeros 2 meses de vida (Carpenter y col., 2003; Taylor y col., 2001; Baker y col., 1996).

3.5. Conclusión

Las restricciones nutricionales en el último tercio de gestación producen alteraciones en los niveles sanguíneos de GLU y de IGF-1 en ovejas que pueden afectar el desarrollo de órganos reproductivos de sus crías.

Los niveles de GLU e IGF-1 en las corderas se vieron fuertemente afectados durante los primeros días (GLU) y primeras semanas (IGF-1) posteriores al parto, lo que alteraría la foliculogénesis ovárica y el desarrollo de las glándulas uterinas durante los primeros 2 meses de vida. En consecuencia, las corderas nacidas de las ovejas en el grupo “R” muestran un útero más inmaduro que las corderas nacidas de las ovejas en el grupo “C”, a una edad en la que el útero ya tiene que estar histológicamente desarrollado.

Esto haría de suponer que la fertilidad de las crías durante la vida adulta estaría comprometida, con menores tasas de preñez y aumento en los porcentajes de pérdidas

embrionarias/fetales, aunque se aconsejan mayores experiencias con evaluaciones más prolongadas en el tiempo de los grupos de estudio para realizar conclusiones definitivas.

CAPITULO 4: CONCLUSIONES GENERALES

En ambos modelos animales se pudo comprobar que tanto los excesos como las restricciones nutricionales durante gestaciones avanzadas en rumiantes afectarían el metabolismo materno y consecuentemente, el de su cría. Esto tendrá un efecto importante sobre el desarrollo del aparato reproductor de la hembra los primeros meses de vida, tanto a niveles ováricos (observado en vaquillonas y corderas) como uterinos (observado en corderas), haciendo suponer que la fertilidad futura de la descendencia podría verse comprometida durante la vida adulta.

Los resultados presentados sobre excesos y restricciones nutricionales podrían ser extrapolables a distintas explotaciones de producción, como por ejemplo, distintas cabañas bovinas y ovinas para el primer caso, mientras que sistemas de cría bovina se ajustarían al segundo, sobre todo en zonas semi-áridas del país.

Aunque todavía restan trabajos de investigación para dilucidar los efectos de la nutrición en hembras gestantes de distintas especies sobre la fertilidad en la vida adulta de las crías hembras, los resultados aquí presentados son de gran importancia para veterinarios, ingenieros agrónomos, zootecnistas y técnicos afines. Ellos pueden ser un aporte más para concientizar a los productores argentinos sobre la importancia de una nutrición balanceada de hembras preñadas, mejorando la planificación de la oferta nutricional durante el año y evitando carencias o excesos cuali-cuantitativos de alimentos, ya que ayudarán a expresar el máximo potencial reproductivo de sus crías que se reflejará en mejores índices de rentabilidad financiera de los establecimientos.

CAPITULO 5: REFERENCIAS

- Adamiak S.J., Mackie K., Watt R.G., Webb R., Sinclair K.D., 2005. Impact of nutrition on oocyte quality: Cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biol. Reprod.* 73:918-926.
- Aerts J.M., Bols P.E., 2010. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reprod Domest Anim* 45, 171–179.
- Alfaro N.S., Salvetti N.R., Velazquez M.M., Stangaferro M.L., Rey F., Ortega H.H., 2011. Steroid receptor mRNA expression in the ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. *Veterinary Science* 92;478–485.
- Al Naib A., Tucker H.L.M., Xie G., Keisler D.H., Bartol F.F., Rhoads R.P., Akers R.M., Rhoads M.L., 2016. Prepubertal tamoxifen treatment affects development of heifer reproductive tissues and related signaling pathways *J. Dairy Sci.* 99:1–13.
- Armstrong D.T., Xia P., de Gannes G., Tekpetey F.R. and Khamsi F., 1996. Differential Effects of Insulin-Like Growth Factor-I and Follicle-Stimulating Hormone on Proliferation and Differentiation of Bovine Cumulus Cells and Granulosa Cells. *Biology of reproduction*, 54, 331-338.
- Baker J., Hardy M.P., Zhou J., Bondy C., Lupu F., Belivé A.R., Efstratiadis A., 1996. Effects of an IGF-1 Gene Null Mutation on Mouse Reproduction. *Molecular Endocrinology* 10: 903-918.
- Baker J., Liu J.P., Robertson E.J., Efstratiadis A., 1993. Role of insulin-like growth factors in embryonic and post-natal growth. *Cell* 75, 73–82.
- Balboula A.Z., Yamanaka K., Sakatani M., Kawahara M., Hegab A.O., Zaabel S.M., Takahashi M., 2013. Cathepsin B activity has a crucial role in the developmental competence of bovine cumulus–oocyte complexes exposed to heat shock during in vitro maturation. *Reproduction*, 146:407–417.
- Baldrigui J.M., Siqueira A.F., Assis P.M., Sá Filho M.F., Visintin J.A., Nogueira G.P., Baruselli P.S., Assumpção M.E.O.A., 2013. Hormonal evaluation during the ovulatory cycle of Holstein, Gir and Buffalo heifers at the same enviromental and nutritional management. Page 415 in *Proc. Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Animal Reproduction, Praia do Forte -BA- Brazil.*
- Barker D.J., Osmond C., Simmonds S.J., Wield G.A., 1993. The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *Br Med J.*; 306: 422–426.

- Baruselli P.S., Batista E.O.S., Vieira L.M., Souza A.H., 2015. Manipulación de la dinámica folicular y efectos del número de folículos de la hormona antimulleriana (AMH) sobre la fertilidad. XI Simposio Internacional de Reproducción Animal - IRAC, Córdoba, Argentina. pp.43-72.
- Baruselli P.S., Vieira L.M., Sá Filho M.F., Mingoti R.D., Ferreira R.M., Chiaratti M.R., Oliveira L.H., Sales J.N., Sartori R., 2016. Associations of insulin resistance later in lactation on fertility of dairy cows. *Theriogenology*:1-7.
- Bassett N.S., Brier B.H., Hodgkinson S.C., Dans S.R., Henderson H.W., Gluckman P.D., 1990. Plasma clearance of radio labelled IGF-I in the late gestation ovine fetus. *J. Dev. Physiol.* 14, 73–79.
- Batista E.O.S., Macedo G.G., Sala R.V., Ortolan M., Sá Filho M.F., Del Valle T.A., Jesus E.F., Lopes R., Rennó F.P., Baruselli P.S., 2014. Plasma anti-mullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. *Reprod Domest Anim*, 49:448-452.
- Battaglia F.C., Meschia G., 1978. Principle substrates of fetal metabolism. *Physiol. Rev* 58:499-527.
- Bell A.W., Hay W.W.J., Ehrhardt R.A., 1999. Placental transport of nutrients and its implications for fetal growth. *J Reprod Fertil Suppl*;54: 401–410.
- Bettegowda A., Patel O.V., Lee K.B., Park K.E., Salem M., Yao J., Ireland J.J., Smith G.W., 2008. Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. *Biology of Reproduction* 79 301–309.
- Bó G.A., Baruselli P.S., Moreno D., Cutaia L., Caccia M., Tríbulo R., Tríbulo H., Mapletoft R.J., 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57(1):53-72.
- Bonavera J.J., Dube M.G., Kalra P.S., Kalra S.P., 1994. Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide-Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 134, 2367.
- Borwick S.C., Rhind S.M., McMillen S.R., Racey P.A., 1997. Effect of undernutrition of ewes from the time of mating on fetal ovarian development in mid gestation. *Reprod. Fertil. Dev.*9:711–715.
- Brameld J.M., Mostyn A., Dandrea J., Stephenson T.J., Dawson J.M., Buttery P.J., Symonds M.E., 2000. Maternal nutrition alters the expression of insulin-like growth factors in fetal sheep liver and skeletal muscle. *J. Endocrinol.* 167, 429–437.
- Breton C., Lukaszewski M.A., Risold P.Y., Enache M., Guillemot J., Riviere G., 2009. Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. *Am.J.Physiol. Endocrinol. Metab.* 296,E462–472.

- Broberger C., 2005. Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *J Intern Med.* 258, 301.
- Cardenas H., Burke K.A., Bigsby R.M., Pope W.F., Nephew K.P., 2001. Estrogen receptor beta in the sheep ovary during the estrous cycle and early pregnancy. *Biology of Reproduction* 65; 128–134.
- Carpenter K.D., Gray C.A., Bryan T.M., Welsh Jr. T.H., Spencer T.E., 2003. Estrogen and anti-estrogen effects on neonatal ovine uterine development. *Biol Reprod*; 69:708–717.
- Carpenter K.D., Hayashi K., Spencer T.E., 2003. Ovarian regulation of endometrial gland morphogenesis and activin-follistatin system in the neonatal ovine uterus. *Biol Reprod*;69(3):851–860.
- Chango A., Pogribny I.P., 2015. Considering maternal dietary modulators for epigenetic regulation and programming of the fetal epigenome. *Nutrients*;7(4):2748–70.
- Cheong Y., Sadek K.H., Bruce K.D., Macklon N., Cagampang F.R., 2014. Diet-induced maternal obesity alters ovarian morphology and gene expression in the adult mouse offspring. *Fertility and Sterility®* Vol. 102, No.3.
- Cripps R.L., Martin-Gronert M.S., Archer Z.A., Hales C.N., Mercer J.G., Ozanne S.E., 2009. Programming of hypothalamic neuropeptide gene expression in rats by maternal dietary protein content during pregnancy and lactation. *Clin.Sci.* 117,85–93.
- Cushman R.A., McNeel A.K., Freetly H.C., 2014. The impact of cow nutrient status during the second and third trimesters on age at puberty, antral follicle count, and fertility of daughters. *Livestock Science* 162:252–258.
- Da Silva P., Aitken R.P., Rhind S.M., Racey P.A., Wallace J.M., 2002. Impact of maternal nutrition during pregnancy on pituitary gonadotrophin gene expression and ovarian development in growth-restricted and normally grown late gestation sheep fetuses. *Reproduction* 123, 769–777.
- Da Silva P., Aitken R.P., Rhind S.M., Racey P.A., Wallace J.M., 2003. Effect of maternal overnutrition during pregnancy on pituitary gonadotrophin gene expression and gonadal morphology in female and male sheep at day 103 of gestation. *Placenta* 24, 248–257.
- de Boo H.A., Harding J.E., 2006. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*;46(1):4–14.
- De la Sota R.L., 2006. Relación entre el plano energético y la fertilidad. En: Manejo reproductivo en rodeos de leche. De la Sota, Rodolfo Luzbel. Córdoba, Argentina. pp. 79-98.
- De Robertis E.D.P., De Robertis (h) E.M.F., 1984. *Biología Celular y molecular*. Tercera reimpresión. 5to cap, Bioquímica de la célula, 5-5. Ácidos nucleicos:81-86.

- Delahaye F., Breton C., Risold P.Y., Enache M., Dutriez-Casteloot I., Laborie C., 2008. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces post-natal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology* 149,470–475.
- Demeestere I., Gervy C., Centner J., Devreker F., Englert Y., Delbaere A., 2004. Effect of Insulin-Like Growth Factor-I During Preantral Follicular Culture on Steroidogenesis, In Vitro Oocyte Maturation, and Embryo Development in Mice. *Biol Reprod*;70:1664–1669.
- Dong F., Ford S.P., Nijland M.J., Nathanielsz P.W., Ren J., 2008. Influence of maternal undernutrition and overfeeding on cardiac ciliary neurotrophic factor receptor and ventricular size in fetal sheep. *J. Nutr. Biochem.* 19 (6), 409–414.
- 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. *The Animal Consortium*; 1031–1044.
- Dupont S., Krust A., Gansmuller A., Dierich A., Chambon P., Mark M., 2000. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127, 4277–4291.
- Eckery D.C., Tisdall D.J., Health D.A., McNatty K.P., 1996. Morphology and function of the ovary during fetal and early neonatal life: A comparison between the sheep and brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Animal Reproduction Science*, 42(1-4), 551-561.
- Edwards L.J., McMillen I.C., 2001. Maternal undernutrition increases arterial blood pressure in the sheep fetus during late gestation. *J Physiol*;533(Pt2):561–70.
- Ehrhardt R.A., Bell A.W., 1995. Growth and metabolism of the ovine placenta during mid-gestation. *Placenta* 16, 727–741.
- Erickson D.H., 1966. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.* 11:97–105.
- Erickson D.H., 1966b. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci* 25, 800–805.
- Evans A.C., 2003. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod Domest Anim*; 38:240–246.
- Evans A.C.O., Mossa F., Walsh S.W., Scheetz D., Jimenez-Krassel F., Ireland J.L.H., Smith G.W., Ireland J.J., 2012. Effects of Maternal Environment During Gestation on Ovarian Folliculogenesis and Consequences for Fertility in Bovine Offspring. *Reprod Dom Anim* 47(4):31–37.
- Felice M. 2013. *La Condición Corporal en Ovinos*. Ediciones INTA-EEA Valle Inferior de Río Negro.

- Ferguson J.D., 1996. Implementation of a body condition scoring program in dairy herds. Proc. Penn. Annual Veterinary Conf. Univ. Of Pennsylvania. Kennet Square, PA.
- Ferreira R.M., Chiaratti M.R., Habermann Macabelli C., Rodrigues C.A., Ferraz M.L., Watanabe Y.F., Smith L.C., Meirelles F.V., Baruselli P.S., 2016. The Infertility of Repeat-Breeder Cows During Summer Is Associated with Decreased Mitochondrial DNA and Increased Expression of Mitochondrial and Apoptotic Genes in Oocytes. *Biology of Reproduction* 94 (3):66, 1–10.
- Funston R.N., Larson D.M., Vonnahme K.A., 2010. Effects of maternal nutrition on conceptus growth and offspring performance: implications for beef cattle production. *J. Anim. Sci.* 88, E205–E215.
- Gallaher B.W., Breier B.H., Blum W.F., McCutcheon S.N., Gluckman P.D., 1995. A homologous radioimmunoassay for ovine insulin-like growth factor-binding protein-2: ontogenesis and the response to growth hormone, placental lactogen and insulin-like growth factor-1 treatment in sheep. *J. Endocrinol.* 144, 75–82.
- Gao F., Zhang C.Z., Liu Y.C., 2015. Effects of feed intake restriction during late pregnancy on maternal metabolic changes and fetal development in ewes. *Czech J. Anim. Sci.*, 60(12): 557–563.
- Gardner D.S., Tingey K., Van Bon B.W., Ozanne S.E., Wilson V., Dandrea J., Keisler D.H., Stephenson T., Symonds M.E., 2005. Programming of glucose-insulin metabolism in adult sheep after maternal undernutrition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, R947–R954.
- Gardner D.S., Buttery P.J., Daniel Z., Symonds M.E., 2007. Factors affecting birth weight in sheep: maternal environment. *Reproduction* 133 (1), 297–307.
- Gardner D.S., Ozanne S.E., Sinclair K.D., 2009. Effect of the early-life nutritional environment on fecundity and fertility of mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 364(1534), 3419-3427.
- Godfrey K.M., Barker D.J., 2000. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr.* 71(5): 1344S–1352S.
- Gray C.A., Bartol F.F., Tarleton B.J., Wiley A.A., Johnson G.A., Bazer F.W., 2001. Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod*;65(5):1311–23.
- Grazul-Bilska A.T., Caton J.S., Arndt W., Burchill K., Thorson C., Boroczyk E., Bilski J.J., Redmer D.A., Reynolds L.P., and Vonnahme K.A., 2009. Cellular proliferation and vascularization in ovine fetal ovaries: Effects of undernutrition and selenium in maternal diet. *Reproduction* 137:699–707.
- Guedon L., Saumande J., Desbals B., 1999. Relationships between calf birth weight, parturition concentrations of plasma energy metabolites and resumption of ovulation postpartum in limousine suckled beef cows. *Theriogenology* 52, 779–789.

- Halaas J.L., Gajiwala K.S., Maffei M., Cohen S.L., Chait B.T., Rabinowitz D., Lallone R.L., Burley S.K., Friedman J.M., 1995. Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 269, 543.
- Hernandez-Medrano J.H., Campbell B.K., Webb R., 2012. Nutritional Influences on Folliculogenesis. *Reprod Dom Anim*; 47(4):274-282.
- Hoffman M.L., Rokosa M.A., Zinn S.A., Hoagland T.A., Govoni K.E., 2014. Poor maternal nutrition during gestation in sheep reduces circulating concentrations of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein (IGFBP)-3 in offspring. *Domestic Animal Endocrinology*, doi: 10.1016.
- Holland M.D., Hossner M.D., Williams S.E., Wallace C.R., Niswerder G.D., Odde K.G., 1997. Serum concentrations of insulin-like growth factors and placental lactogen during gestation in cattle: fetal profiles. *Dom. Anim. Endocrinol.* 14, 231–239.
- Holtenius K., Agenäs S., Delavaud C., Chilliard Y., 2003. Effects of feeding intensity during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses. *J Dairy Sci*, 86:883-891.
- Holtenius P., Holtenius K., 2007. A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows. *Acta Vet Scand*;49:29.
- Honaramooz A., Aravindakshan J., Chandolia R.K., Beard A.P., Bartlewski P.M., Pierson R.A., Rawlings N.C., 2004. Ultrasonographic evaluation of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers *Animal Reproduction Science* 80;15–29.
- Igwebuike U.M., 2010. Impact of maternal nutrition on ovine foetoplacental development: A review of the role of insulin-like growth factors. *Anim. Reprod. Sci.* 121,189–196.
- Igwebuike U.M., 2009. A review of uterine structural modifications that influence conceptus implantation and development in sheep and goats. *Anim. Reprod. Sci.* 112, 1–7.
- Ireland J.J., Mihm M., Austin E., Diskin M.G., Roche J.F., 2000. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. *J Dairy Sci.*83, 1648–1658.
- Ireland J.J., Scheetz D., Jimenez-Krassel F., Folger J.K., Smith G.W., Mossa F., Evans A.C.O., 2010: Evidence that Mammary Gland Infection/ Injury During Pregnancy in Dairy Cows may have a Negative Impact on Size of the Ovarian Reserve in their Daughters 43rd Annual Meeting for the Society for Study of Reproduction. Milwaukee, WI.
- Ireland J.J., Smith G.W., Scheetz D., Jimenez-Krassel F., Folger J.K., Ireland J.L., Mossa F., Lonergan P., Evans A.C., 2011: Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle *Reprod Fertil Dev* 23, 1-14.

- Ireland J.J., Zielak A.E., Jimenez-Krassel F., Folger J., Bettgowda A., Scheetz D., Walsh S., Mossa F., Knight P.G., Smith G.W., Lonergan P., Evans A.C.O., 2009. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biol Reprod* 80, 954–964.
- Ireland J.L.H., Scheetz D., Jimenez-Krassel F., Themmen A.P., Ward F., Lonergan P., Smith G.W., Perez G.I., Evans A.C., Ireland J.J., 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod* 79, 1219–1225.
- Jansen H.T., West C., Lehman M.N., Padmanabhan V., 2001. Ovarian estrogen receptor-beta (ERbeta) regulation: I. Changes in ERbeta messenger RNA expression prior to ovulation in the ewe. *Biology of Reproduction* 65 866–872.
- Jimenez-Krassel F., Folger J.K., Ireland J.L., Smith G.W., Hou X., Davis J.S., 2009. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. *Biol Reprod*;80:1272–81.
- Jimenez-Krassel F., Scheetz D.M., Neuder L.M., Ireland J.L.H., Pursley J.R., Smith G.W., Tempelman R.J., Ferris T., Roudebush W.E., Mossa F., Lonergan P., Evans A.C.O., Ireland J.J., 2015. Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. *J. Dairy Sci.* 98:1–10.
- Juengel J.L., Heath D.A., Quirke L.D., McNatty K.P., 2006. Oestrogen receptor α and β , androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localisation within the developing ovary and in small growing follicles of sheep. *Reproduction*, 131: 81–92.
- Kalra S.P., Dube M.G., Pu S., Xu B., Horvath T.L., Kalra P.S., 1999. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev.* 20, 68.
- Kenyon P.R., 2008. A review of in-utero environmental effects on sheep production. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 68, 142-155.
- Kotsampasi B., Chadio S., Papadomichelakis G., Deligeorgis S., Kalogiannis D., Menegatos I., Zervas G., 2009. Effects of Maternal Undernutrition on the Hypothalamic–Pituitary–Gonadal Axis Function in Female Sheep Offspring. *Reprod Dom Anim*; 44, 677–684.
- Krege J.H., Hodgin J.B., Couse J.F., Enmark E., Warner M., Mahler J.F., Sar M., Korach K.S., Gustafsson J.A., Smithies O., 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15677–15682.
- La Torraca A., 2015. Sistemas de producción. En: Actualización en producción ovina 2015. Mueller J.P., Cueto M.I., Robles C.A. San Carlos de Bariloche, Argentina. pp. 5-20.
- Lacau-Mengido I.M., Mejía M.E., Díaz-Torga G.S., Gonzalez Iglesias A., Formía N., Libertun C., Becú-Villalobos D., 2000. Endocrine studies in ivermectin-treated heifers from birth to puberty. *J. Anim. Sci.* 78:817–824.

- Lea R.G., Andrade L.P., Rae M.T., Hannah L.T., Kyle C.E., Murray J.F., Rhind S.M., Miller D.W., 2006. Effects of maternal undernutrition during early pregnancy on apoptosis regulators in the ovine fetal ovary. *Reproduction* 131, 113-124.
- LeBlanc S., 2015. El efecto de la salud durante el período de transición sobre el rendimiento reproductivo de las vacas lecheras. XI Simposio Internacional de Reproducción Animal - IRAC, Córdoba, Argentina. pp.73-87.
- Leiva T., Cooke R.F., Brandão A.P., Aboin A.C., Ranches J., Vasconcelos J.L.M., 2015. Effects of excessive energy intake and supplementation with chromium propionate on insulin resistance parameters, milk production, and reproductive outcomes of lactating dairy cows. *Livestock Sci*;180:121-8.
- Lekatz L.A., Wu G., Caton J.S., Taylor J.B., Reynolds L.P., Redmer D.A., Vonnahme K.A., 2011. Maternal selenium supplementation and timing of nutrient restriction in pregnant sheep: impacts on nutrient availability to the fetus. *Journal of Animal Science*, 89, 59-76.
- Lemley C.O., Meyer A.M., Neville T.L., Hallford D.M., Camacho L.E., Maddock-Carlin K.R., 2014. Dietary selenium and nutritional plane alter specific aspects of maternal endocrine status during pregnancy and lactation. *Domest Anim Endocrinol*;46:1-11.
- Liu J.P., Baker J., Perkins A.S., Robertson E.J., Efstratiadis A., 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type-1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75, 59-72.
- Long N.M., Prado-Cooper M.J., Krehbiel C.R., Wettemann R.P., 2010. Effects of nutrient restriction of bovine dams during early gestation on postnatal growth and regulation of plasma glucose. *J. Anim. Sci.* 88,3262-3268.
- Long N.M., Tousley C.B., Underwood K.R., Paisley S.I., Means W.J., Hess B.W., Du M., Ford S.P., 2012. Effects of early- to mid-gestational undernutrition with or without protein supplementation on offspring growth, carcass characteristics, and adipocyte size in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 90, 197-206.
- Long N.M., Vonnahme K.A., Hess B.W., Nathanielsz P.W., Ford S.P., 2009. Effects of early gestational undernutrition on fetal growth, organ development, and placental composition in the bovine. *J. Anim. Sci.* 87, 1950-1959.
- Lopez M., Seoane L.M., Tovar S., Garcia M.C., Nogueiras R., Dieguez C., 2005. A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat. *Diabetologia* 48,140-148.
- Lucas V. 2012. Estimación del estado corporal, una herramienta útil al alcance de todos. *Producir XXI*, Bs. As., 20(243):43-50. Publicado en internet, disponible en <http://www.produccion-animal.com.ar/ProduccionBovinadeleche/CondicionCorporal/Estimaciondelestadocorporal,unaherramientautilalalcancedetodos>.

- Martin J.L., Vonnahme K.A., Adams D.C., Lardy G.P., Funston R.N., 2007. Effects of dam nutrition on growth and reproductive performance of heifer calves. *J. Anim. Sci.* 85, 841–847.
- Martinez M.F., Sanderson N., Quirke L.D., Lawrence S.B., Juengel J.L., 2015. Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. *Theriogenology*,1–10.
- McNatty K.P., Fidler A.E., Juengel J.L., Quirke L.D., Smith P.R., Heath D.A., Lundy T., O’Connell A. and Tisdall D.J., 2000. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 163:11–20.
- McNatty K.P., Smith P., Hudson N.L., Heath D.A., Tisdall D.J., O W.S. and Braw-Tal R., 1995. Development of the sheep ovary during fetal and early neonatal life and the effect of fecundity genes. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 49:123–135.
- Medina C.L., Nagatani S., Darling T.A., Bucholtz D.C., Tsukamura H., Maeda K.I., Foster D.L., 1998. Glucose availability modulates the timing of the luteinising hormone surge in the ewe. *J. Endocrinol.*10, 785-792.
- Meinhardt U., Mullis P.E., 2002. The essential role of the aromatase/p450arom. *Semin. Reprod. Med.* 20:277–284.
- Menzies P.I., 2007. Reproductive health management programs. En: *Current therapy in large animal theriogenology*, second edition. Youngquist R., Threlfall W. Philadelphia, USA. pp.701-714.
- Micke G.C., Sullivan T.M., Magalhaes R.J.S., Rolls P.J., Norman S.T., Perry V.E.A., 2010. Heifer nutrition during early- and mid-pregnancy alters fetal growth trajectory and birth weight. *Animal Reproduction Science*, 117, 1–10.
- Monget P. and Martin G.B., 1997. Involvement of insulin-like growth factors in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals. *Human Reproduction*;12(1):33-52.
- Mossa F., Carter F., Walsh S.W., Kenny D.A., Smith G.W., Ireland J.L., 2013. Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. *Biol Reprod*;88(4):92.
- Mossa F., Jimenez-Krassel F., Folger J.K., Ireland J.L.H., Smith G.W., Lonergan P., Evans A.C.O., Ireland J.J., 2010. Evidence that high variation in antral follicle count during follicular waves is linked to alterations in ovarian androgen production in cattle. *Reproduction*,140:713–720.
- Mossa F., Walsh S.W., Butler S.T., Berry D.P., Carter F., Lonergan P., Smith G.W., Ireland J.J., Evans A.C., 2012. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with poor fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:2355–2361.

- Muhlhausler B.S., McMillen I.C., Rouzaud G., Findlay P.A., Marrocco E.M., Rhind S.M., Adam C.L., 2004. Appetite regulatory neuropeptides are expressed in the sheep hypothalamus before birth. *J Neuroendocrinol.* 16, 502.
- Muhlhausler B.S., Adam C.L., Findlay P.A., Duffield J.A., McMillen I.C., 2006. Increased maternal nutrition alters development of the appetite-regulating network in the brain. *FASEB J.* 20, E556–E565.
- Muhlhausler B.S., Adam C.L., Marrocco E.M., Findlay P.A., Roberts C.T., McFarlane J.R., Kauter K.G., McMillen I.C., 2005. Impact of glucose infusion on the structural and functional characteristics of adipose tissue and on hypothalamic gene expression for appetite regulatory neuropeptides in the sheep fetus during late gestation. *J. Physiol.* 565, 185–195.
- Muñoz-Gutierrez M., Blache D., Martin G.B., Scaramuzzi R.J., 2004. Ovarian follicular expression of mRNA encoding the type I IGF receptor and IGF-binding protein-2 in sheep following five days of nutritional supplementation with glucose, glucosamine or lupins. *Reproduction*; 128.747–756.
- Nayak N.R., Giudice L.C., 2003. Comparative biology of the IGF system in endometrium, decidua, and placenta, and clinical implications for foetal growth and implantation disorders. *Placenta.* 24, 281.
- Novakovic B., Yuen R.K., Gordon L, Penaherrera M.S., Sharkey A., Moffett A., 2011. Evidence for widespread changes in promoter methylation profile in human placenta in response to increasing gestational age and environmental/stochastic factors. *BMC Genomics*;12:529.
- NRC 1985. Nutrient requirements of sheep. National Academies Press.
- Oliver M.H., Harding J.E., Breier B.H., Evans P.C., Gluckman P.D., 1993. Glucose but not a mixed amino acid infusion regulates plasma insulin-like growth factor-I concentrations in fetal sheep. *Pediatric research.* 34, 62.
- Oskerby J.C., Wathes D.C., Howard D., Gadd T.S., 2002. The effect of maternal undernutrition on ovine fetal growth. *Journal of Endocrinology*;173:131–141.
- Owens J.A., Kind K.L., Carbone F., Robinson J.C., Owens P.C., 1994. Circulating insulin-like growth factor-I and II and substrate in fetal sheep following restriction of placental growth. *J. Endocrinol.* 140, 5–13.
- Plagemann A., 2006. Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. *Horm. Res.* 65 (Suppl. 3), 83–89.
- Plagemann A., Harder T., Kohlhoff R., Rhode W., Dorner G., 1997. Overweight and obesity in infants of mothers with long-term insulin-dependent diabetes or gestational diabetes. *Int. J. Obes. Rel. Metabol. Disord.* 21, 451–456

- Pralong F.P., 2010. Insulin and NPY pathways and the control of GnRH function and puberty onset. *Mol Cell Endocrinol* 324, 82-86.
- Quigley S.P., Kleemann D.O., Walker S.K., Speck P.A., Rudiger S.R., Natrass G.S., De Blasio M.J., Owens J.A., 2008. Effect of Variable Long-Term Maternal Feed Allowance on the Development of the Ovine Placenta and Fetus. *Placenta* 29; 539-548.
- Rae M.T., Kyle C.E., Miller D.W., Hammond A.J., Brooks A.N., Rhind S.M., 2002c. The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. *Animal Reproduction Science* 72: 63–71.
- Rae M.T., Palassio S., Kyle C.E., Brooks A.N., Lea R.G., Miller D.W., and Rhind S.M., 2001. Effect of maternal undernutrition during pregnancy on early ovarian development and subsequent follicular development in sheep fetuses. *Reproduction* 122:915–922.
- Randhawa R., Cohen, P., 2005. The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth. *Molecular Genetics and Metabolism* 86; 84–90.
- Reik W., Dean W., Walter J., 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*;293(5532):1089–93.
- Reynolds L.P., Redmer D.A., 1995. Utero–placental vascular development and placental function. *Journal of Animal Science* 73:1839–1851.
- Ribeiro E.S., Bisinotto R.S., Lima F.S., Greco L.F., Morrison A., Kumar A., Thatcher W.W., Santos J.E.P., 2014 .Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *J. Dairy Sci.* 97:6888–6900.
- Rico C., Fabre S., Medigue C., Di Clemente N., Clement F., Bontoux M., Touze J. L., Dupont M., Briant E., Remy B., Beckers J. F., and Monniaux D., 2009. Anti-mullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol. Reprod.*80:50–59.
- Rivas López P.C., Suarez Londono A., Ramírez Cardona E., 2011. Influencia de las hormonas metabólicas y la nutrición en el desarrollo folicular en el ganado bovino: implicaciones prácticas. *Rev. Med. Vet.*,21:155-173.
- Robinson J.J., Sinclair K.D., McEvoy T.G., 1999. Nutritional effects on fetal growth. *Animal Science*, 68, 315–331.
- Russe I, 1983. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca Anatomica* 24, 77–92.
- Samanc H., Danijela K., Stojic V., Dragica S., Vujanac I., Prodanovic R., 2011. Application of the metabolic profile in the prediction and diagnosis of fatty liver in Holstein cows. *Acta Vet Beograd* 61:543–553.
- Sánchez-Criado J.E., Trudgen K., Millán Y., Blanco A., Monterde J., Garrido-Gracia J.C., Gordon A., Aguilar R., de las Mulas J.M., Ko C.M., 2012. Estrogen receptor (ESR) 2

- partially offsets the absence of ESR1 in gonadotropes of pituitary-specific ESR1 knockout female mice. *Reproduction* 143:549–558.
- Sangsrivong S., Combs D.K., Sartori R., Wiltbank M.C., 2002. High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. *J Dairy Sci*;85:2831-2842.
- Santos S.S.D., Ferreira M.A.P., Pinto J.A., Sampaio R.V., Carvalho A.C., Silva T.V.G., Costa N.N., Cordeiro M.S., Miranda M.S., Ribeiro H.F.L., Oashi O.M., 2013. Characterization of folliculogenesis and the occurrence of apoptosis in the development of bovine fetal ovary. *Theriogenology* 79:344-350.
- Saper C.B., Chou T.C., Elmquist J.K., 2002. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron*. 36, 199.
- Sartori R., Guardieriro M.M., Surjus R.S., Canavessi A.M.O., Melo L., Prata A.B., Bastos M.R., 2013. Fatores nutricionais que afetam a reprodução em gado de corte e leiteiro. X Simposio Internacional de Reproducción Animal - IRAC, Córdoba, Argentina. pp.49-61.
- 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.
- Scaramuzzi R.J., Campbell B.K., Downing J.A., Kendall N.R., Khalid M., Munoz-Gutierrez M., Shimizu T., Krebs S., Bauersachs S., Blum H., Wolf E., Miyamoto A., 2010. Actions and interactions of progesterone and estrogen on transcriptome profiles of the bovine endometrium. *Physiol Genomics* 42A: 290–300.
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., et al., 2012. "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", *Nature methods* 9(7): 676-682.
- Schwartz M.W., Figlewicz D.P., Baskin D.G., Woods S.C., Porte D.J., 1992. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev*. 13, 387.
- Shimizu T., Krebs S., Bauersachs S., Blum H., Wolf E., Miyamoto A., 2010. Actions and interactions of progesterone and estrogen on transcriptome profiles of the bovine endometrium. *Physiol Genomics* 42A: 290–300.
- Shin B.C., Dai Y., Thamocharan M., Gibson L.C., Devaskar S.U., 2012. Pre-and post natal calorie restriction perturbs early hypothalamic neuropeptide and energy balance. *J. Neurosci. Res.* 90,1169–1182.
- Silverman B.L., Rizzo T.A., Cho N.H., Metzger B.E., 1998. Long-term effects of the intrauterine environment. *Diabetes Care* 21, B142–B149.
- Smitz J.E., Cortvrindt R.G., 2002. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction*;123(2):185–202.

- 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.
- Spiegler S., Kaske M., Köhler U., Meyera H.H.D., Schwarz F.J., Wiedemann S., 2014. Effect of feeding level of pregnant dairy heifers sired by one bull on maternal metabolism, placental parameters and birth weight of their female calves. *Animal Reproduction Science* 146:148–156.
- Spiller C.M., Bowles J., Koopman P., 2012. Regulation of germ cell meiosis in the fetal ovary. *Int. J. Dev. Biol.* 56:779–787.
- Su H., Wang Y., Zhang Q., Wang F., Cao Z., Aziz-ur-Rahman M., Cao B., Li S., 2013. Responses of energy balance, physiology, and production for transition dairy cows fed with a low-energy prepartum diet during hot season. *Tropical Animal Health and Production*, 45, 1495–1503.
- Symonds M.E., Budge H., Stephenson T., McMillen I.C., 2001. Fetal endocrinology and development –manipulation and adaptation to long-term nutritional and environmental challenges. *Reproduction*, 121, 853–862.
- Tanaka Y., Nakada K., Moriyoshi M., Sawamukai Y., 2001. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. *Reproduction* 121, 777–782.
- Taylor K.M., Chen C., Gray C.A., Bazer F.W., Spencer T.E., 2001. Expression of messenger ribonucleic acids for fibroblast growth factors 7 and 10, hepatocyte growth factor, and insulin-like growth factors and their receptors in the neonatal ovine uterus. *Biol Reprod*;64(4):1236–46.
- Taylor K.M., Gray C.A., Joyce M.M., Stewart M.D., Bazer F.W., Spencer T.E., 2000. Neonatal ovine uterine development involves alterations in expression of receptors for estrogen, progesterone, and prolactin. *Biol Reprod*;63(4):1192–204.
- Tomanek M., Pisselet C., Monget P., Madigou T., Thieulant M.L., Monniaux D., 1997. Estrogen receptor protein and mRNA expression in the ovary of sheep. *Molecular Reproduction and Development* 48;53–62.
- Toori M.A., Mosavi E., Nikseresht M., Barmak M.J., Mahmoudi R., 2014. Influence of Insulin-Like Growth Factor-I on Maturation and Fertilization Rate of Immature Oocyte and Embryo Development in NMRI Mouse with TCM199 and α -MEM Medium. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, Vol.8(12):AC05-AC08.
- Trevisi E., Amadori M., Cogrossi S., Razzuoli E., Bertoni G., 2012. Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. *Research in Veterinary Science* 93, 695-704.

- Vatnick I., Schoknecht P.A., Darrigrand R., Bell A.W., 1991. Growth and metabolism of the placenta after unilateral fetectomy in twin pregnant ewes. *J. Dev. Physiol. (Oxf.)* 15, 351–356.
- Vickers M.H., Breier B.H., Cutfield W.S., Hofman P.L., Gluckman P.D., 2000. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hyper caloric nutrition. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279, E83–E87.
- Vitt U.A., McGee E.A., Hayashi M., Hsueh A.J., 2000. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker Cyp17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology* 141:3814–3820.
- Wallace J.M., Bourke D.A., Aitken R.P., Palmer R.M., Da Silva P. and Cruickshank M.A., 2000. Relationship between nutritionally-mediated placental growth restriction and fetal growth, body composition and endocrine status during late gestation in adolescent sheep. *Placenta* 21:100–108.
- Wallace J.M., Bourke D.A., Da Silva P., Aitken R.P., 2001. Nutrient partitioning during adolescent pregnancy. *Journals of Reproduction and Fertility*;1470-1626.
- Wallace J.M., Milne J.S., Aitken R.P., Hay W.W. Jr., 2007. Sensitivity to metabolic signals in late-gestation growth-restricted fetuses from rapidly growing adolescent sheep. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*293: E1233–E1241.
- Wallace J.M., Milne J.S., Matsuzaki M., Aitken R.P., 2008. Serial Measurement of Uterine Blood Flow From Mid to Late Gestation in Growth Restricted Pregnancies Induced by Overnourishing Adolescent Sheep Dams. *Placenta* 29:718-724.
- Wallace J.M., Aitken R.P., Cheyne M.A., 1996. Nutrient partitioning and fetal growth in rapidly growing adolescent ewes. *J. Reprod. Fertil.* 107,183–190.
- Wallace J.M., Bourke D.A., Aitken R.P., Milne J.S., Hay W.W., 2003. Placental glucose transport in growth-restricted pregnancies induced by overnourished adolescent sheep. *J. Physiol.* 547:85–94.
- Walsh S.W., Mossa F., Butler S.T., Berry D.P., Scheetz D., Jimenez-Krassel F., Tempelman R.J., Carter F., Lonergan P., Evans A.C.O., Ireland J.J., 2014. Heritability and impact of environmental effects during pregnancy on antral follicle count in cattle. *J. Dairy Sci.* 97:4503–4511.
- 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.
- Weller M.M.D.C.A., Fortes M.R.S., Marcondes M.I., Rotta P.P., Gionbeli T.R.S., Valadares Filho S.C., Campos M.M., Silva F.F., Silva W., Moore S., Guimarães S.E.F., 2016. Effect of maternal nutrition and days of gestation on pituitary gland and gonadal gene expression in cattle. *J. Dairy Sci.* 99:3056–3071.

- Wiley A.A., Bartol F.F., Barron D.H., 1987. Histogenesis of the Ovine Uterus. *J. Anim. Sci.*64:1262-1269.
- Wittrock J.A.M., 2012. Associations among neutrophil function, metabolic indicators, and reproductive health in dairy cows. MSc Thesis, University of Guelph.
- Woods S.C., Seeley R.J., Porte D., Schwartz M.W., 1998. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*. 280, 1378.
- Wrobel K.H., Suss F., 1998. Identification and temporospatial distribution of bovine primordial germ cells prior to gonadal sexual differentiation. *Anat Embryol (Berl)*;197(6):451–67.
- Xiao E., Kim A.J., Dutia R., Conwell I., Ferin M., Wardlaw S.L., 2010. Effects of estradiol on cerebrospinal fluid levels of agouti-related protein in ovariectomized rhesus monkeys. *Endocrinology*. 151, 1002.
- Yang M.Y., Fortune J.E., 2008. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biol Reprod* 78, 1153–1161.
- Ying S. J., Xiao S.H., Wang C.L., Zhong B.S., Zhang G.M., Wang Z.Y., He D.Y., Ding X.L., Xing H.J., Wang F., 2013. Effect of nutrition on plasma lipid profile and mRNA levels of ovarian genes involved in steroid hormone synthesis in Hu sheep during luteal phase. *J. Anim. Sci.*91:5229–5239.
- Yuen B.S., Owens P.C., McFarlane J.R., Symonds M.E., Edwards L.J., Kauter K.G., et al., 2002. Circulating leptin concentrations are positively related to leptin messenger RNA expression in the adipose tissue of fetal sheep in the pregnant ewe fed at or below maintenance energy requirements during late gestation. *Biol Reprod*;67(3):911–6.
- Yura S., Itoh H., Sagawa N., Yamamoto H., Masuzaki H., Nakao K., 2005. Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab*. 1,371–378.
- Zhang K.C., Tan X., 2007. Progress in the study of nutritional manipulation of NEFA in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science and Technology*, 29, 149–152.
- Zhang L., Longa N.M., Hein S.M., Ma Y., Nathanielsz P.W., Forda S.P., 2011. Maternal obesity in the ewe results in reduced fetal pancreatic β -cell numbers in late gestation, and decreased circulating insulin concentration at term. *Domest Anim Endocrinol.*;40(1):30–39.