



CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS Y EXPRESIÓN GÉNICA DE BLASTOCISTOS EN DOS LÍNEAS SELECCIONADAS DE CONEJO

TESIS DE MASTER

M^aDolores Llobat Bordes

DIRECTOR: Jose S. Vicente Antón

Valencia, Julio 2009

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi director de tesis Jose Salvador Vicente Antón, por el aprendizaje y ayuda recibidos, además de comprensión y apoyo.

A mi compañero Paco, por su gran ayuda, apoyo y comprensión. A Raquel, que ha sido y es compañera de master, de despacho y de piso, porque sin su apoyo y ayuda el año hubiera sido mucho más difícil. A mis compañeras de master, Marina y Llibertat ('les valencianetes del Nord'), por haber hecho tan divertido un año tan duro. A los profesores que forman parte del master, por este año tan duro pero tan productivo. A todos los compañeros del departamento de Ciencia Animal, en especial al personal de granja, por su gran trabajo y su ayuda en todo lo que se nos ocurre.

Y, por supuesto, a mis padres y hermana, por apoyarme, comprenderme y ayudarme siempre en todo momento.

A la fundación AGROALIMED por la financiación recibida para la realización de la presente tesis de master.

RESUMEN

La importancia del estudio de la fisiología reproductiva del conejo (*Oryctolagus cuniculus*) viene dada por un lado, por su carácter como animal de laboratorio de interés en biomedicina y, por otro como especie de interés zootécnico. Como modelo biomédico permite estudiar los procesos fisiológicos pre-implantacionales dado que es una especie de ovulación inducida y la cronología de los procesos puede seguirse con mayor precisión que en otras especies, guardando gran similitud con los de la especie humana. Además, es una especie de interés ganadero, de forma que se han desarrollado sistemas productivos intensivos basados en la selección genética, adecuación de dietas, control de factores ambientales y manejos reproductivos propios. Por estos motivos, en este trabajo se han tratado de caracterizar a nivel reproductivo dos líneas de conejo seleccionadas por diferente criterio, estudiando diferentes parámetros. Los resultados obtenidos han mostrado diferencias en varios de estos parámetros entre las dos líneas, entre los que se encuentran la inducción de la ovulación, el número de embriones implantados a los 12 días de gestación y el tamaño de camada. Con el fin de estudiar algunas de las posibles causas de estas diferencias en el número de embriones implantados, en la segunda parte del trabajo se ha analizado la expresión génica de algunos genes relacionados con el fenómeno de implantación embrionaria en blastocistos de 5 y 6 días, como son el Oct4, la Integrina, los Interferones γ y ω , el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), el receptor 3 del Factor de Crecimiento Epidérmico (erbB3) y el Factor β de Crecimiento Transformante (TGF- β). Todos los genes estudiados se expresan en blastocistos expandidos de conejo a 5 y 6 días de gestación, si bien los genes relacionados con la diferenciación celular (Oct4 y TGF- β) no presentaron diferencias estadísticamente significativas en sus niveles de expresión relativa. Sin embargo, genes relacionados con el reconocimiento materno-embriionario (Interferones γ y ω) y con el proceso de vascularización *de novo* (VEGF, erbB3) mostraron un incremento en su expresión relativa en blastocistos de 5 días de desarrollo respecto a los de 6 días. Por otro lado, la subunidad β 3 de la Integrina, relacionada, por un lado con procesos angiogénicos y de diferenciación celular y, por otro, con mecanismos de adhesión entre el blastocisto y el endometrio, se expresó en un menor porcentaje de embriones de 5 días.

ABSTRACT

Reproductive physiology of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) are important because two reasons. First, this specie is very relevant as laboratory animal in biomedicine, and on the other hand, this presents zootechnical interest. As animal model, there provides to study of preimplantational process, that presents handling easy, induced ovulation and chronology of processes can be followed more closely than other species. Moreover, in the first steps their embryonic development is very similar to human. Furthermore, it is a species of zootechnical interest for farmer relevance, so that production systems have been developed based on intensive genetic selection, adequacy of diets, control of environmental factors and development of reproductive management. For these reasons, in this work we tried to characterize to study of different reproductive parameters, two rabbit lines selected by different criteria. The results have shown significant differences in several of these parameters between two lines, including ovulation induction and implantation rates, and also litter size. In order to study possible causes of these differences in implantation rate, in the second study we have analyzed relative expression of some genes related with embryonic implantation in blastocysts of these two rabbit lines, as Oct4, Integrin, γ and ω Interferons, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Epidermal Growth Factor receptor 3 (erbB3) and Transformant Growth Factor β (TGF- β). All genes studied have been shown expression in hatched blastocysts of days 5 and 6, although related genes with cellular differentiation (Oct4 and TGF- β) have not present differences in their expression levels. However, related genes with maternal-embryonic recognition (Interferons γ and ω) and also related with neovascularization (VEGF and erbB3) showed higher relative expression in blastocysts at day 5 than day 6. Subunit β 3 of integrin related with angiogenic and cellular differentiation processes and also with adhesion mechanisms between blastocyst and endometrium was expressed at a lower number of blastocyst at day 5.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN

1.1. El conejo como modelo animal	13
1.2. El conejo como especie zootécnica	13
1.3. Factores reguladores de la Implantación	15
1.4. Elección de los genes objeto de estudio	22

II. OBJETIVOS DE LA TESIS DE MASTER

2.1. Objetivos	29
-----------------------	-----------

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Animales	31
3.2. Experimento 1. Caracterización de parámetros reproductivos	
3.2.1. Manejo reproductivo	31
3.2.2. Laparoscopias de Diagnóstico	32
3.2.3. Obtención de suero sanguíneo	32
3.2.4. Cuantificación de los niveles de progesterona sérica	32
3.2.5. Análisis estadístico	33
3.3. Experimento 2. Expresión génica en blastocistos de 5 y 6 días de las líneas A y R	
3.3.1. Obtención de blastocistos	34
3.3.2. Obtención de ARN mensajero y ADN complementario	35
3.3.3. Cuantificación por PCR en Tiempo Real	36
3.3.4. Análisis de datos de PCR en Tiempo Real	38
3.3.5. Análisis estadístico	38

IV. RESULTADOS	
4.1. Experimento 1. Caracterización de parámetros reproductivos	
4.1.1. Inducción de la ovulación, tasa de ovulación, número de embriones implantados y tamaño de camada	41
4.1.2. Análisis de niveles séricos de progesterona	42
4.2. Experimento 2. Expresión génica de blastocistos de 5 y 6 días de las líneas A y R	
4.2.1. Eficacia de la PCR en Tiempo Real	45
4.2.2. Análisis de la expresión génica	46
V. DISCUSIÓN	
5.1. Discusión	50
VI. CONCLUSIONES	
6.1. Conclusiones	58
VII. BIBLIOGRAFÍA	
7.1. Bibliografía	60

TABLAS

Tabla 1.3a. Factores de transcripción relacionados con la pluripotencialidad celular, indicando sus ligandos, células que los expresan, y fenotipos que éstas presentan por ganancia o pérdida de la función de dicho factor **18**

Tablas 1.3b y 1.3c. Principales combinaciones de las dos subunidades que componen el dímero Integrina, indicando sus ligandos, el tipo celular y el organismo donde se ha demostrado su expresión **20 y 21**

Tabla 3.3.3. Cebadores específicos, secuencias de GenBank utilizadas para el diseño de estos y tamaño del fragmento amplificado de cada uno de los transcritos analizados (Oct4 como transcrito del gen POU1F, subunidad $\beta 3$ de la Integrina, Interferones $\omega 48$ y γ (IFN- $\omega 48$ and IFN- γ), VEGF como Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular, erbB3 como Receptor 3 del Factor de Crecimiento Epidérmico, TGF- β como Factor de Crecimiento Transformante β y β -actina como gen de referencia (*housekeeping*) utilizado **37**

Tabla 4.1.2a. Resultados obtenidos sin incluir covariables para las variables reproductivas estudiadas para cada uno de los efectos fijos incluidos en el modelo **43**

Tabla 4.1.2b. Resultados obtenidos incluyendo tanto la tasa de ovulación y el número de embriones implantados como covariables para las variables reproductivas estudiadas para cada uno de los efectos fijos incluidos en el modelo **44**

Tabla 4.2.1. Información relativa a las curvas de cuantificación relativa y eficiencias de las reacciones de PCR, además de los coeficientes de variación interplaca para cada uno de los genes estudiados: $\beta 3$ -Integrina como subunidad $\beta 3$ de Integrina, IFN- γ y IFN- $\omega 48$ como Interferón γ y $\omega 48$ respectivamente, VEGF como Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular, erbB3 como Receptor 3 del Factor de Crecimiento Epidérmico, TGF- β como Factor β de Crecimiento Transformante y gen de referencia (*housekeeping*) utilizado (β -actina) **45**

Tabla 4.2.2. Correlaciones de Pearson entre la expresión relativa (expresada como el logaritmo en base 10 de $2^{-\Delta\Delta Ct}$) de los genes estudiados: Oct4, subunidad $\beta 3$ de Integrina

(Integrin $\beta 3$), Interferón γ (Ifn- γ), Interferón $\omega 48$ (Ifn- $\omega 48$), VEGF como Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular, erbB3 como Receptor 3 del Factor de Crecimiento Epidérmico y TGF- β como Factor de Crecimiento Transformante β . La tabla muestra los coeficientes de correlación y los valores de P de esta correlación por parejas de genes **48**

FIGURAS

Figura 1.2. La organización de la selección, mejora y difusión genética en conejos se realiza mediante un cruce a tres vías, donde dos líneas maternas son seleccionadas por caracteres reproductivos y el individuo producto del cruce de estas dos líneas se cruza con una tercera línea, llamada paternal, seleccionada por caracteres de crecimiento y/o producción 14

Figura 1.3a. Relaciones más relevantes entre hormonas sexuales y sus receptores, indicando su regulación positiva o negativa 16

Figura 1.3b. Detalle de la superficie del lumen endotelial de rata en el día 6 posterior a la fecundación 19

Figura 1.3c. Moléculas cuya acción es fundamental en el proceso implantatorio y la relación entre ellas 22

Figura 1.4a. Relaciones de factores relacionados con la calidad embrionaria y con la diferenciación celular en el desarrollo de los diferentes estadios de un cigoto de ratón 23

Figura 1.4b. Esquema de la presencia y función de TGF- β en diferentes tipos celulares relacionados con la implantación 24

Figura 1.4c. Mecanismos de señalización en los que el VEGF contribuye al fenómeno de angiogénesis y su participación en el desarrollo de la interfaz útero-placentaria mediante cambios proliferativos, invasivos, de vasodilatación y de permeabilidad, esenciales para la invasión celular y angiogénesis 26

Figura 3.1. Fotografía de hembras de cada una de las líneas de selección objeto de estudio con sus respectivas camadas 31

Figura 3.2.1. Detalle del momento de realización del método Elisa para cuantificar niveles séricos de progesterona 33

Figura 3.3.1a. Detalles del momento de realización de laparoscopia	35
Figura 3.3.1b. Fotografía de blastocisto recuperado a los cinco días de gestación	35
Figura 3.3.3. Curva de fusión: especificidad del producto amplificado	38
Figura 4.2.2a. Porcentaje de blastocistos de diferentes edades que expresan los genes estudiados	46
Figura 4.2.2b. Expresión relativa de ARN mensajero de todos los genes estudiados en diferentes momentos de desarrollo embrionario	47
Figura 4.2.2c. Expresión relativa de todos los genes estudiados en las dos líneas de selección	47

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN.

1.1. El conejo como modelo animal.

Con el fin de estudiar los mecanismos implantacionales, se han utilizado diferentes especies animales como modelos. El conejo, por ejemplo, es un buen modelo animal para estudiar las interacciones materno-embriónicas durante la etapa de implantación dado que, además de ser un animal de fácil manejo, es una especie de ovulación inducida y la cronología de los procesos de ovulación, fecundación e implantación pueden ser establecidos con bastante precisión. Además, el tipo de implantación que presentan estos animales es céntrica, es decir, el blastocisto se fusiona con las células endometriales al igual que ocurre en la especie humana. De este modo, el conejo se presenta como una especie idónea para el estudio de los mecanismos de implantación en el ser humano, no sólo *in vivo* sino también *in vitro*. De hecho, existen en la bibliografía numerosos ejemplos de la utilización de embriones y tejido uterino de esta especie como modelo para la observación del desarrollo embrionario en humanos puesto que se ha comprobado, además, que ambas especies presentan desarrollos embrionarios *in vitro* muy similares hasta el noveno día de cultivo (Hohn *et al.*, 1992). Incluso se ha comprobado que estas analogías entre el desarrollo embrionario humano y del conejo son exactas, ya que se han realizado estudios mediante análisis de imagen de crecimiento de notocorda, tubo neural, etc., en los que se ha observado que estas estructuras son prácticamente idénticas en ambas especies hasta el noveno día de cultivo *in vitro*, tanto en morfología como en tamaño y desarrollo (Tao y Niemann, 2000; Carver *et al.*, 2003).

1.2. El conejo como especie zootécnica.

Su docilidad, comportamiento y parámetros reproductivos, así como su alimentación no competitiva con el ser humano, hacen del conejo una especie de interés ganadero. Como en otras especies ganaderas, se han desarrollado sistemas productivos intensivos basados en la selección genética, en la adecuación de dietas, en el control de factores ambientales y en el desarrollo de manejos reproductivos propios.

La organización de la mejora genética en conejo se ha realizado tradicionalmente mediante el cruce a tres vías (Figura 1.2), esto es, se comercializa el producto final del cruce entre un macho

procedente de una línea paternal, normalmente seleccionada por caracteres de crecimiento, y una hembra híbrida, procedente del cruce entre dos líneas maternas seleccionadas por caracteres reproductivos. En la Universidad Politécnica de Valencia se seleccionan diferentes líneas. Entre éstas, se ha seleccionado durante 25 generaciones una línea paternal, la línea R, seleccionada mediante selección individual por ganancia media diaria durante el periodo de engorde, y tres líneas maternas, la línea A, seleccionada durante 39 generaciones mediante un índice familiar por tamaño de camada al destete, la línea V, seleccionada también por tamaño de camada al destete pero mediante el método BLUP sobre un modelo animal con repetibilidad durante 35 generaciones y la línea H, seleccionada mediante el método BLUP por tamaño de camada al destete sobre un criterio de selección previo de longevidad durante 4 generaciones.

ORGANIZACIÓN DE LA MEJORA GENÉTICA CUNÍCOLA

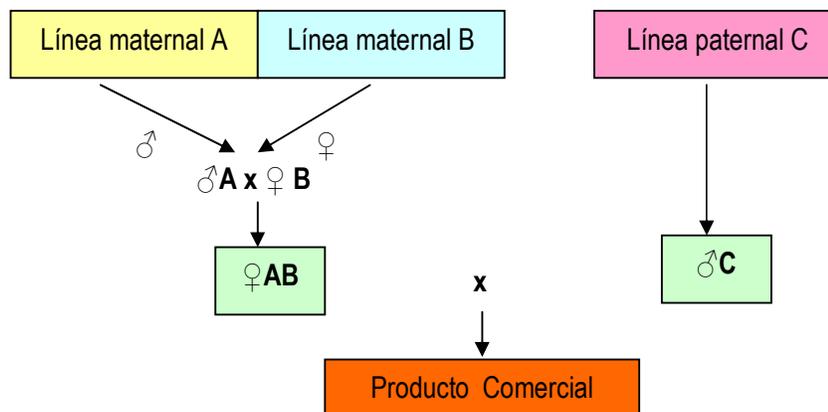


Figura 1.2. La organización de la selección, mejora y difusión genética en conejos se realiza mediante un cruce a tres vías, como se muestra en el esquema, donde dos líneas maternas son seleccionadas por caracteres reproductivos y el individuo producto del cruce de estas dos líneas se cruza con una tercera línea, llamada paternal, seleccionada por caracteres de crecimiento y/ producción. El producto comercial será el resultado de este segundo cruce.

De las líneas seleccionadas en la UPV, la línea R, seleccionada por velocidad de crecimiento, alcanza los menores tamaños de camada. Este parámetro depende, en última instancia, de tres sucesos fundamentales: el número de óvulos liberados durante la ovulación (tasa de ovulación), la fecundación de esos óvulos liberados (tasa de fecundación) y, por último, tanto del número de embriones que, una vez fecundados, llegan a implantarse (supervivencia

embrionaria) como del número de embriones implantados que se desarrollan y llegan a parto (supervivencia fetal). Trabajos anteriores demuestran que la línea seleccionada por velocidad de crecimiento (línea R) presenta tasas de ovulación y de fecundación similares a líneas seleccionadas por tamaño de camada (Vicente *et al.*, 2003; Mehaisen *et al.*, 2005). Estos resultados demuestran que las diferencias reproductivas y, en concreto, en el tamaño de camada de estas dos líneas, no son consecuencia de diferencias en las tasas de ovulación y fecundación, sino del desarrollo embrionario tardío y de los procesos de implantación, placentación y desarrollo fetal (supervivencia prenatal). Por otro lado, el efecto de factores genéticos en la supervivencia prenatal ha sido estudiado en diferentes especies como conejos (Torres *et al.*, 1987; Bolet and Theau-Clément, 1994), cerdos (Wilson *et al.*, 1998) y ratones (Ernst *et al.*, 2000). Esta supervivencia prenatal y, por tanto, la correcta implantación de los óvulos ya fecundados, depende tanto del genotipo materno como del embrionario. Mocé *et al.* (2004) muestran que la mayor parte de la supervivencia embrionaria depende del genotipo materno pero otros autores apuntan que el genotipo embrionario podría modificar, incluso, las secreciones uterinas (Hoffman *et al.*, 1998; Wilson y Ford, 1997), con lo que las pérdidas prenatales no dependerían exclusivamente de factores maternos.

La mortalidad embrionaria en conejo, es decir, las pérdidas que ocurren desde la fecundación hasta la implantación en el útero (día 7 de gestación), se han estimado entre el 10 y el 14% (Quintela *et al.*, 2001; Santacreu *et al.*, 2005). Esta implantación consiste en dos fases: la primera de ellas, hasta el 7 día de gestación y la segunda a partir del día 8. Las mayores pérdidas pre-implantacionales ocurren en esta primera fase de la implantación (Adams, 1960; Wathes, 1992) y dependen fundamentalmente de tres factores, la calidad de los ovocitos fecundados, los procesos de ovulación y fecundación y, por último, el correcto desarrollo de la interacción materno-embionaria (Carson *et al.*, 2000).

1.3. Factores reguladores de la implantación.

La implantación es el mecanismo por el cual el embrión se adhiere al epitelio endometrial de la hembra estableciendo diferentes interacciones con éste. Este fenómeno presenta distintas etapas, de las que la primera de ellas será la aposición del blastocisto en el epitelio endometrial. Esta primera etapa ocurre hacia el quinto día después de la fecundación. Posteriormente, hacia los días sexto y séptimo, llega la segunda etapa de la implantación, esto es, la fase adhesión en la que el blastocisto establecerá una conexión física con el endometrio. Finalmente llega la última

etapa, en la que se produce una invasión del endometrio por parte de las células trofoblásticas, de forma que se rompe la lámina basal endometrial alcanzando vasos sanguíneos maternos, además de crear nueva vascularización para su supervivencia.

Los mecanismos de regulación del fenómeno de implantación no se conocen totalmente. Para que ésta se efectúe correctamente es necesario, en primer lugar, la presencia de un blastocisto capaz de implantarse y, en segundo, el desarrollo de un endometrio susceptible de albergar a este blastocisto desarrollado. La regulación de estas dos acciones viene dada, en mayor o menor grado, por hormonas esteroides ováricas (Figura 1.3^a) y, en concreto, por la progesterona. Esta hormona ovárica será la responsable de la preparación del tracto reproductor para la implantación del cigoto y el mantenimiento posterior de la gestación. La síntesis de progesterona es uno de los primeros pasos en la síntesis de andrógenos y estrógenos en el interior de las células de la teca. Sin embargo, el principal productor de esta hormona es el cuerpo lúteo.

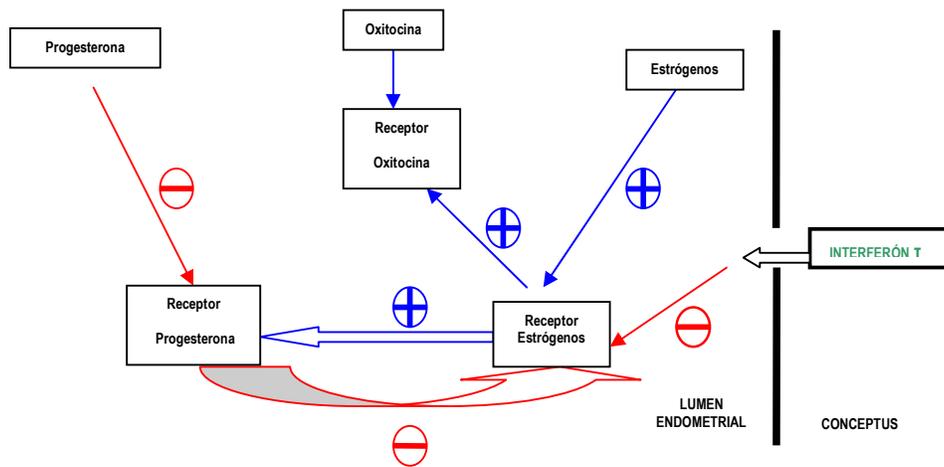


Figura 1.3a. En el esquema se muestran algunas de las relaciones más importantes entre hormonas sexuales y sus receptores, indicando su regulación positiva o negativa. Además, se muestra como ejemplo, uno de los factores producidos por el embrión, en concreto el Interferón τ , citoquina con actuación demostrada en el proceso de implantación en rumiantes.

Después de la fijación del embrión en el endometrio uterino, es fundamental que se establezca una comunicación entre blastocisto y útero para dar lugar a la formación de la placenta y, por tanto, de la unidad feto-placentaria. Además, la placenta es capaz de transformar

el colesterol aportado por la circulación materna en progesterona, que liberará para el mantenimiento de la implantación, placentación y posterior desarrollo fetal (Spencer *et al.*, 2004). Esta hormona se ha sugerido como uno de los factores que regulan la invasión por parte del trofoblasto mediante la inhibición de diferentes endopeptidasas, como las Metaloproteinasas de Matriz MMP-2 o la MMP-9 (Shimonovitz *et al.*, 1998; Goldman y Shalev, 2006). Además, diferentes trabajos han demostrado la actuación de estas MMP que, mediante diferentes receptores intracelulares, son capaces de inducir la activación de genes que codifican distintos factores reguladores (Beato, 1989; Spelsberg *et al.*, 1989; Evans y Itoh, 2007).

Dado que el primer fenómeno necesario para una correcta implantación es la presencia de un blastocisto capaz de implantarse, los primeros mecanismos de regulación de dicha implantación serán los que den lugar a un blastocisto que pueda adherirse e interactuar posteriormente con el endometrio materno. Por tanto, para que esta implantación ocurra es necesario, en primer lugar, el desarrollo del embrión hasta el estadio de blastocisto en el que se producirá la diferenciación de dos tipos celulares iniciales, el trofoblasto que dará lugar a la placenta, y la masa celular interna o embrioblasto, que dará lugar al embrión. De esta forma, las células trofoblásticas se diferenciarán y perderán su pluripotencialidad, mientras que las células de la masa celular interna seguirán siendo pluripotentes, ya que tendrán que dar lugar más adelante a los diferentes tipos celulares.

Esta pérdida de pluripotencialidad por parte del trofoblasto es fundamental para la posterior adhesión al endometrio por parte del blastocisto y está regulada por un gran número de factores, tanto epigenéticos como reguladores de la transcripción, que influyen en la actividad de muchos otros transcritos que afectan al correcto desarrollo del blastocisto. De estos factores reguladores, se les ha dado una importancia mayor a dos de ellos que, además, presentan homeodominios en sus estructuras. Éstos son el gen Oct4 (perteneciente a la familia génica POU) y Nanog, que se expresan de forma predominante en células pluripotentes. Otros productos de transcripción relevantes en el proceso de desarrollo embrionario que se han encontrado en células pluripotentes son las proteínas Sox2, Stat3, Cdx2 y las proteínas de unión Gata4 y Gata6 (Boyer *et al.*, 2006).

En la tabla 1.3a se muestran diferentes factores de transcripción relacionados con esta pluripotencialidad en diversos organismos. En muchos de ellos, se conoce el fenotipo que se

obtiene al perder la funcionalidad de dicho transcrito (organismos *knock-out*) o bien, cuando el gen que codifica para ese factor se inserta en células indiferenciadas (*Stem Cells*).

Factor de Transcripción	Familia Proteica	Patrones de Expresión	Fenotipo por pérdida de función		Fenotipo por ganancia de función en Stem Cells
			Desarrollo embrionario	Stem Cells	
Oct4	Familia Proteica Pit-Oct-Onc	Oocito, Embrión Fertilizado, Células Germinales, Masa Celular Interna (ICM), Epiblasto, Células de Carcinoma Embrionario, Células Indiferenciadas (Stem Cells)	Letal en Blastocistos, Diferenciación de Epiblasto en Trofoectodermo	Pérdida de pluripotencialidad, Diferenciación en Trofoectodermo	Diferenciación en Trofoectodermo primario y Mesodermo
Nanog	Nuevo Homeodominio Proteico	Mórula, ICM, Epiblasto, Células de Carcinoma Embrionario, Células Germinales, Stem Cells	Letal en Blastocistos, Pérdida de Epiblasto, Diferenciación de ICM en Endodermo primario	Pérdida de pluripotencialidad, Diferenciación en Endodermo primario	Renovación celular independiente de Stat3-LIF, Diferenciación inducida por Resistencia a Ácido Retinoico
Sox2	Proteínas High Mobility Group (HGM-Box) relacionadas con SRY	Oocito, ICM, Epiblasto, Células Germinales, Células Multipotentes de Ectodermo Extraembrionario, Células neurales, Arcos Braquiales, Endodermo	Letal en Blastocisto, Fallos en el mantenimiento del Epiblasto	Desconocida	Desconocida
Stat3	Traductor de Señales y Activador de Familia Proteica Transcripcional	Amplia gama de tipos celulares	Letal en Blastocisto	Diferenciación en Endodermo primario y Mesodermo (la señalización por Stat3 es indispensable en Stem Cells de humano)	Renovación Celular independiente de LIF
Cdx2	Proteínas de Homeodominio tipo Caudal	Células externas en Mórula, Células de Trofoectodermo	Letal en Blastocisto debido a fallos de implantación (pérdida funcional de trofoectodermo)	Contribución Normal en todas las líneas celulares excepto en células de Trofoectodermo e Intestinales	Diferenciación en Trofoblasto
Gata6	Proteínas de unión GATA	Endodermo Extraembrionario	Letal en Blastocisto, Defectos en Formación de Endodermo Visceral	Desconocida	Diferenciación en Endodermo primario
Gata4	Proteínas de unión GATA	Endodermo Extraembrionario	Letal en Blastocisto, Defectos en Morfogénesis Cardíaca	Puede generar miocitos cardíacos, pérdida de función de generación de Endodermo Visceral y Endodermo Definitivo	Diferenciación en Endodermo primario

Tabla 1.3a. Factores de transcripción relacionados con la pluripotencialidad celular, indicando sus ligandos, células que los expresan, y fenotipos que éstas presentan por ganancia o pérdida de la función de dicho factor.

La siguiente etapa en el proceso de implantación es la adhesión, en la que el blastocisto entrará en contacto físico con el endometrio materno. En esta etapa intervienen un gran número de productos de transcripción entre los que se encuentran factores de crecimiento, moléculas de adhesión y citoquinas. Estas moléculas serán importantes ya que, en este punto, será necesario no sólo que el blastocisto siga desarrollándose, si no que, además, debe tanto adherirse al endotelio uterino como evitar ser atacado por el sistema inmune de la hembra. Se ha observado que, probablemente debido a la progesterona, la membrana epitelial apical forma unas estructuras o pinopodos en el útero (Figura 1.3b) que podrían favorecer la adhesión del trofoblasto y que, en este fenómeno de adhesión, intervendría la E-cadherina, molécula presente en los pinopodos. Posteriormente, estudios *in vitro* demostraron que no existía contacto directo entre el blastocisto y estos pinopodos (Lopata *et al.*, 2002).

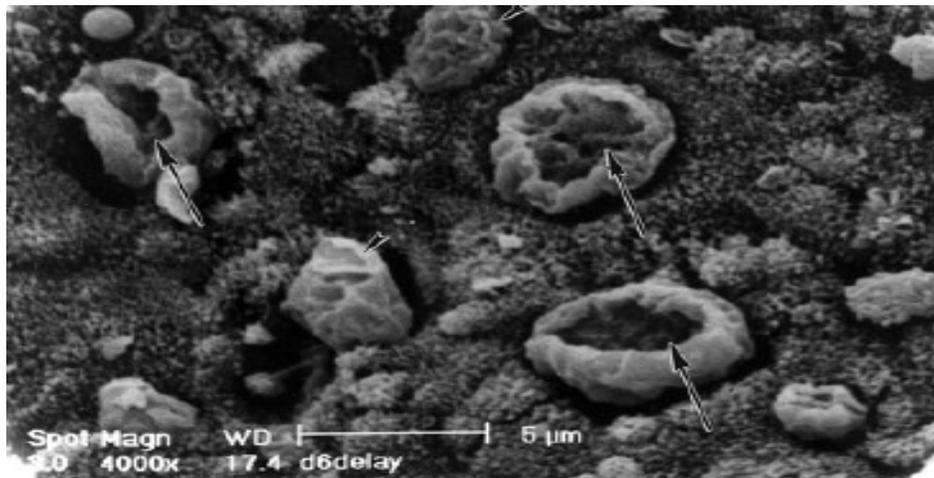


Figura 1.3b. Detalle de la superficie del lumen endotelial de rata en el día 6 posterior a la implantación. Muchas de las células que se observan presentan pequeños microvillios pero sólo algunos pinopodos pueden verse proyectados en la superficie (Lopata *et al.*, 2002).

Las integrinas, glicoproteínas heterodiméricas de membrana, también se han relacionado con este fenómeno de adhesión. Sus diferentes subunidades se han encontrado en el endometrio y se ha demostrado que su cantidad y tipo difieren según el momento del ciclo reproductivo. También se ha observado la producción de subunidades de esta proteína en el trofoectodermo. El trofoblasto modula el tipo de subunidad que expresa durante la invasión y la diferenciación y, según el tipo de subunidad, será capaz de utilizar uno u otro ligando (Bowen y Hunt, 2000) (tablas 1.3b y c)

Tabla 1.3b.

Subunidades	Ligandos	Tipo Celular	Especie
$\alpha 1\beta 1$	Laminina, Colágeno, Perlecan	Embrión	Ratón
		Trofoblasto	Humano, Cerdo
		Epitelio uterino	Cerdo
$\alpha 2\beta 1$	Colágeno	Embrión	Ratón
		Epitelio uterino	Humano
		Ovocito	Roedores
		Granulosa	Rumiantes
		Células de la Teca	Rumiantes
$\alpha 3\beta 1$	Colágeno, Fibronectina, Laminina	Embrión	Humano
		Trofoblasto	Humano, Cerdo
		Epitelio uterino	Humano, Cerdo
		Ovocito	Roedores
		Granulosa	Rumiantes
		Células de la Teca	Rumiantes
$\alpha 4\beta 1$	Fibronectina, Molécula de Adhesión Celular Vascular 1 (VCAM-1)	Embrión	Humano
		Trofoblasto	Ratón, Cerdo
		Epitelio uterino	Humano, Cerdo
		Ovocito	Roedores
$\alpha 5\beta 1$	Fibronectina, Vitronectina	Embrión	Ratón
		Trofoblasto	Humano, Cerdo
		Epitelio uterino	Cerdo
		Ovocito	Roedores
		Ovocito	Roedores
$\alpha 6\beta 1$	Laminina	Embrión	Ratón, Humano
		Trofoblasto	Humano
		Epitelio uterino	Humano
		Ovocito	Roedores, Primates
		Granulosa	Rumiantes

Tabla 1.3c.

Subunidades	Ligandos	Tipo Celular	Especie
$\alpha 7\beta 1$	Laminina	Embrión	Ratón
$\alpha 9\beta 1$	Tenascina	Epitelio uterino	Humano
		Ovocito	Roedores
		Trofoblasto	Ratón, Humano, Cerdo
		Epitelio uterino	Humano, Cerdo
$\alpha V\beta 3$	Perlecan, Fibronectina, Vitronectina, Osteopontina, Factor de von Willebrand, Fibrinógeno, Sialoproteína Ósea 1 (BSP-1), Molécula de Adhesión Celular Endotelial de Plaquetas (PECAM-1)	Embrión	Ratón, Humano
		Trofoblasto	Ratón, Humano, Cerdo
		Epitelio uterino	Humano, Cerdo, Conejo
		Ovocito	Roedores, Primates
		Granulosa	Rumiantes
		Células de la Teca	Rumiantes
		Epitelio Ovárico	Rumiantes, Primates
$\alpha V\beta 5$	Fibronectina, Vitronectina, Osteopontina	Embrión	Humano
		Trofoblasto	Humano
		Epitelio uterino	Humano
		Ovocito	Roedores
$\alpha V\beta 6$	Fibronectina, Tenascina	Embrión	Humano
		Trofoblasto	
		Epitelio uterino	Humano
$\alpha IIb\beta 3$	Fibronectina, Fibrinógeno, Factor de von Willebrand, Vitronectina	Embrión	Ratón

Tablas 1.3.b y 1.3.c En las tablas se muestran las principales combinaciones de las dos subunidades que componen el dímero Integrina, indicando sus ligandos y el tipo celular y el organismo donde se ha demostrado su expresión (adaptado de Bowen y Hunt, 2000; adaptado de Monniaux et al. 2006).

La última etapa de la implantación se produce cuando las células trofoblásticas proliferan en el endometrio materno para alcanzar los vasos sanguíneos, provocando un proceso de angiogénesis. Esta última etapa puede suceder de distintos modos, según la especie. Tanto en conejos como en humanos, se produce una invasión por parte de las células del trofoblasto en el endometrio materno estableciendo uniones gap con las células endometriales. En este punto, la presencia de factores relacionados con la adhesión y también con la neovascularización es fundamental para que el blastocisto se implante correctamente (Figura 1.3c).

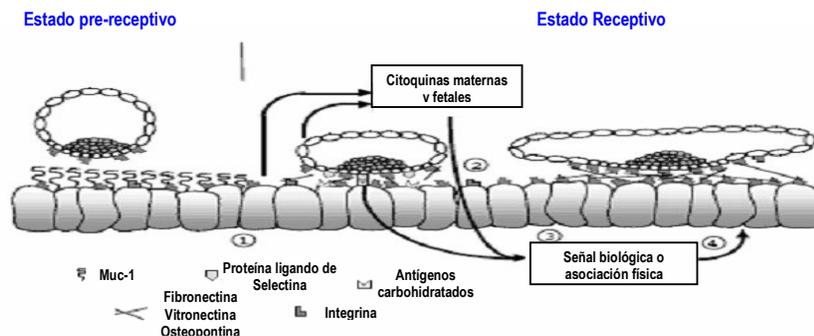


Figura 1.3c. Esquema donde pueden observarse algunas moléculas cuya acción es fundamental en el proceso implantatorio y la relación entre ellas (adaptado de Bowen y Burghardt, 2004).

1.4. Elección de los genes objeto de estudio.

La calidad y correcto desarrollo de los óvulos fecundados está controlada mediante numerosos genes que se expresan en los embriones antes del momento de la implantación. Uno de estos genes es el gen POU5F1, perteneciente a la familia de factores de transcripción POU. Dicho gen presenta un transcrito llamado Oct4, que es el factor de transcripción expresado de forma más temprana. Este transcrito es crucial para el desarrollo pre-implantacional (Nichols *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001; Erhardt *et al.*, 2003) y, además, ha sido relacionado con procesos de diferenciación celular en distintas especies de mamíferos (Pesce *et al.*, 1998; Hansis *et al.*, 2001). La importancia de la actividad de este factor de transcripción durante el desarrollo se ha demostrado ya que, uniéndose al ADN, es capaz de actuar como activador o represor de multitud de genes que se expresan durante el desarrollo embrionario temprano (Smith *et al.*, 2007). Por ejemplo en ratones, su expresión es crucial, dado que tanto el ARN mensajero como el resultado proteico de su traducción se han encontrado en cigotos de ratón cuyos núcleos

estaban en división, mientras que en blastocistos en etapas de expansión, tanto el ARN mensajero como la proteína se encontraban exclusivamente en la masa celular interna (Li *et al.*, 2001; Erhardt *et al.*, 2003). Por otro lado, el Oct4 es producido por células indiferenciadas (*Stem Cell*) embrionarias, células del epiblasto y células de la línea germinal, además de haber sido detectado en células adultas pluripotentes (Schöler *et al.*, 1990; Rosner *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 2002). Incluso se ha encontrado la proteína producto del Oct4 tanto en la masa celular interna como en el trofoectodermo de blastocistos expandidos en bovinos y porcinos. Distintos estudios han demostrado que este transcrito presenta efectos reguladores de genes relacionados con la formación del citoesqueleto celular y con procesos como la apoptosis, ciclo celular y otros procesos metabólicos. Por tanto, el estudio del transcrito Oct4 en embriones puede ser un excelente indicador de la habilidad para desarrollarse de blastocistos pre-implantacionales y, por tanto, de la calidad embrionaria.

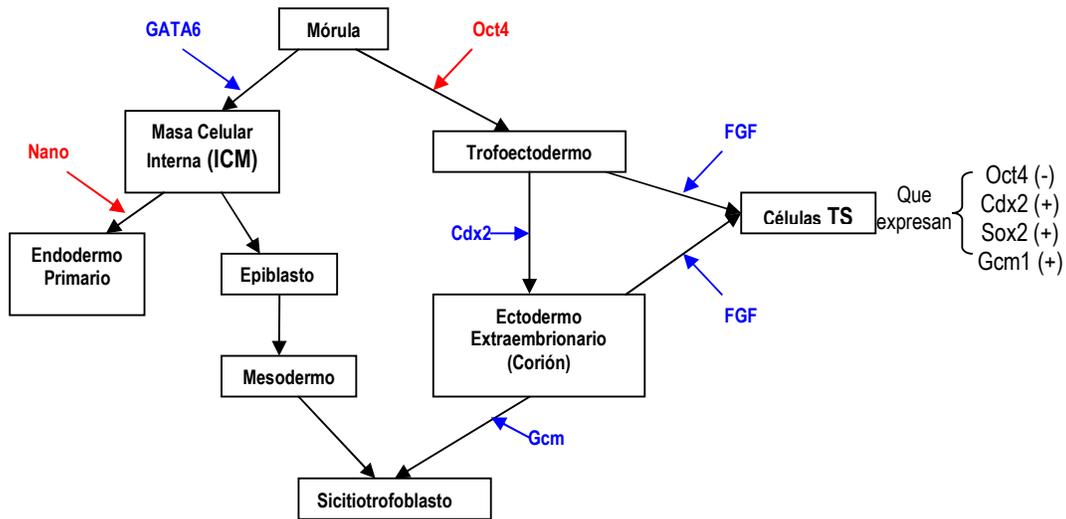


Figura 1.4a. En la figura se muestran las relaciones de algunos factores relacionados con la calidad embrionaria y con la diferenciación celular en el desarrollo de los diferentes estadios de un cigoto de ratón. Aparecen en rojo los transcritos que inhiben la ruta y en azul, los que activan (adaptado de Roberts *et al.* 2004).

Por otro lado, algunos factores de crecimiento también pueden afectar a la maduración y diferenciación de los blastocistos, además de actuar en la interacción útero-embrión. Uno de estos factores es la superfamilia de Factores de Crecimiento Transformantes (TGF) cuyos miembros están directamente relacionados con la remodelación epitelial y los procesos reproductivos en general. En concreto, el TGF- β regula eventos de diferenciación y maduración

de blastocistos (Figura 1.4b), además de modular las interacciones entre útero y embrión durante la implantación (Paria y Dey, 1990; Pauken y Capco, 1999).

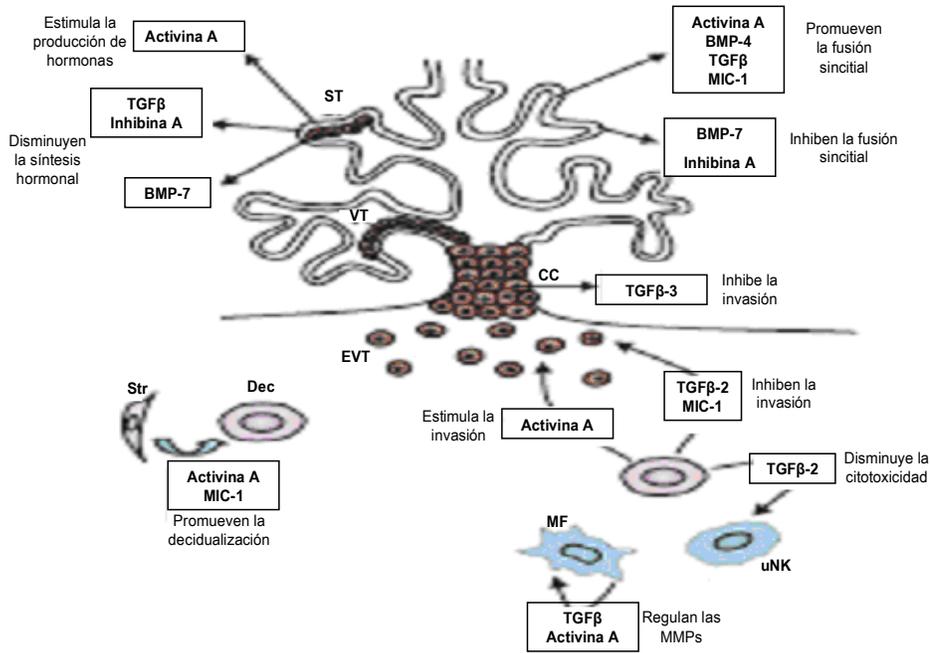


Figura 1.4b. En la figura se muestra un esquema de la presencia y función de TGF-β en diferentes tipos celulares relacionados con la implantación, al igual de la relación de esta molécula con otras que también presentan funciones importantes durante este proceso; ST: sincitiotrofoblasto, VT: capa interior vellosidades del citotrofoblasto; MIC-1: citoquina inhibidora de macrófagos; Str: células del estroma; Dec: células del decidua; TGF: Factor de Crecimiento Transformante; EVT: capa externa vellosidades del citotrofoblasto; CC: columna celular; MF: macrófagos titulares; MMP: Metaloproteinasas de matriz; BMP: proteína morfogenética ósea; uNK: células Natural Killer (NK) indiferenciadas (adaptado de Jones et al. 2006).

Otro importante proceso relacionado con las pérdidas pre-implantacionales en conejo y otros mamíferos es la adhesión al epitelio luminal uterino. Este proceso comprende una cascada de adhesión que ocurre durante la implantación y está regulado por diferentes proteínas y factores. Las integrinas, unos de los factores más importantes asociados a este proceso, son glicoproteínas dominantes en esta cascada de adhesión. Estas proteínas de membrana son heterodímeros catión-dependientes compuestas por dos subunidades, α y β, que unen varios componentes extracelulares de la matriz y otras moléculas de adhesión. De esta forma, actúan como mediadoras en la diferenciación celular, motilidad y adhesión propiamente dicha (Hynes, 2002). Las alteraciones en la expresión de diferentes subunidades de estas integrinas se han

relacionado, por ejemplo, con casos de infertilidad en mujeres (Lessey *et al.*, 1992) y, además, diferentes trabajos muestran que la presencia de algunas subunidades no funcionales de estas integrinas, en concreto la $\beta 3$, reduce el número de lugares de implantación en conejos (Illera *et al.*, 2003). En otras especies, como por ejemplo, en cerdos, ovejas, cabras y vacas, la expresión de distintas subunidades de integrina se ha relacionado con implantaciones no invasivas (Bowen *et al.*, 1996; Guillomot, 1999; Kimmins y McLaren, 1999; Van der Flier y Sonnenberg, 2001).

Además, el proceso de adhesión puede verse afectado por diferentes factores de crecimiento que regulan la vascularización y la motilidad celular. Uno de ellos es el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), relacionado con la vascularización *de novo* en distintos procesos como la implantación, embriogénesis, ciclo menstrual, desarrollo de cuerpos lúteos, desarrollo de folículos ováricos y también, tumorigénesis (Ferrara *et al.*, 1998). Artini *et al.* (2008) han demostrado que la expresión de VEGF aumenta conforme el embrión se desarrolla en humanos. Otro de los factores de crecimiento relacionado con los procesos de implantación y adhesión es el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). Realmente, el EGF comprende una familia de factores que se ha demostrado están relacionados con la implantación, promoviendo la proliferación y diferenciación en embrión y útero (Tamada *et al.*, 1999). Esta familia está formada por siete ligandos y cuatro receptores con actividad tirosin-quinasa, codificados por la familia génica *erbB*. Estos receptores difieren entre sí en la especificidad del ligando y en su actividad quinasa pero la expresión de todos ellos se ha visto en embriones y útero de diferentes especies, con lo que su relación con el proceso implantatorio es muy conocida. En concreto, se han encontrado receptores de EGF en embriones de distintas especies de mamíferos, como por ejemplo en rata (Johnson y Chatterjee, 1993), ratón (Brown *et al.*, 2004) y humano (Pringent *et al.*, 1992).

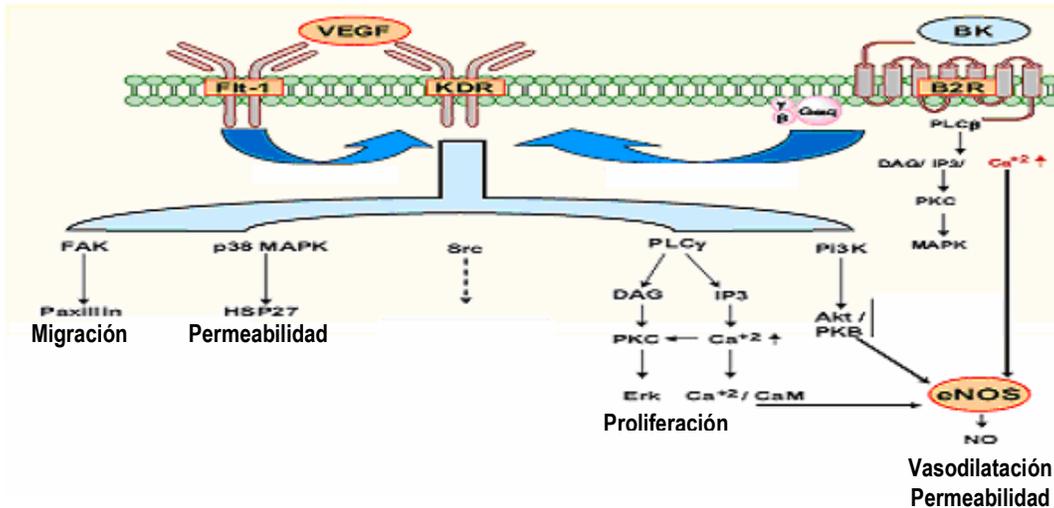


Figura 1.4c. Esquema de mecanismos de señalización en los que el VEGF contribuye al fenómeno de angiogénesis y su participación en el desarrollo de la interfaz útero-placentaria mediante cambios proliferativos, invasivos, de vasodilatación y de permeabilidad, esenciales para la invasión celular y angiogénesis; VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular; BK: Bradiquina; eNOS: Óxido Nítrico Sintasa endotelial; PLC: Fosfolipasa C; DAG: Diacilglicerol; IP3: Inositol (1,4,5)-trifosfato; PKC: Protein Quinasa C; MAPK: Proteína Quinasa Mitógeno-Activada; FAK: Quinasa de Adhesión Focal; PI3K: Fosfoinositol 3-Quinasa; Erk: Quinasa reguladora Extracelular; HSP: Proteína de Choque Térmico; CaM: Calmodulina; EC: Célula Endotelial (adaptado de Valdes et al. 2008).

El reconocimiento materno-embriionario incluye la expresión de diferentes citoquinas observadas en numerosas especies (Sharkey, 1998, Bazer *et al.*, 2009). El embrión sintetiza factores que previenen la activación local de células citotóxicas y que estimulan la producción de citoquinas (Linnemeyer y Pollack, 1993). Algunas de estas citoquinas son interferones. Estos interferones pueden clasificarse en dos familias, interferones de tipo I y de tipo II. La familia de interferones tipo II está compuesta por un único gen, cuyo producto es el Interferón γ (De Maeyer y De Maeyer-Guignard, 1988), considerado el producto primario de las células T y que se ha encontrado en diferentes tipos desde células de trofoblasto porcino (Lefèvre y Boulay, 1990) hasta células de la placenta o de membranas embrionarias humanas (Aboagye-Mathiesen *et al.*, 1995; Bazer *et al.*, 1997). El otro tipo de interferones (tipo I) está compuesto por diferentes subtipos con propiedades biológicas similares y, probablemente, con un mismo receptor. En el tipo I se incluyen los Interferones α -, β - δ - y ω -, además del conocido Interferón τ . Cada subtipo es diferente de los otros respecto a la secuencia aminoacídica y a sus propiedades serológicas, aunque todos han sido relacionados de una forma u otra con el reconocimiento materno-embriionario o bien, con otro tipo de reconocimiento celular en distintas especies. El caso más

claro y estudiado es el del Interferón τ en rumiantes, que es sintetizado por embriones de vaca, cabra y oveja, actuando como señal de reconocimiento durante la gestación (Bazer *et al.*, 1997). Los distintos subtipos de interferones sintetizados por el trofoblasto se han detectado en rumiantes (Imakawa *et al.*, 1987; Charpigny *et al.*, 1988) pero también en otras especies como cerdos (Cross y Roberts, 1989), humanos (Aboagye-Mathiesen *et al.*, 1995), gansos (Li *et al.*, 2007), ratones (Fung *et al.*, 2004) y conejos (Kawasaki *et al.*, 1992; Godornes *et al.*, 2007). En concreto, el Interferón ω (Charlier *et al.*, 1993) y el γ (Muscettola *et al.*, 2003) se han relacionado con la implantación en conejo.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS.

2.1. Caracterización reproductiva de los animales objeto de estudio, pertenecientes a dos líneas de conejo seleccionadas: inducción de la ovulación, tasa de ovulación, embriones implantados a 12 días, tamaño de camada y niveles de progesterona sérica a 12 días.

2.2. Cuantificación relativa de la expresión de diferentes genes relacionados con el desarrollo pre-implantacional, diferenciación celular y pluripotencialidad (Oct4, TGF- β), adhesión y vascularización *de novo* (subunidad β 3 de la integrina, VEGF y erbB3), y reconocimiento materno-embriionario (Interferones ω y γ) en blastocistos morfológicamente normales de las dos líneas seleccionadas a los 5 y 6 días de gestación.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Animales.

Este trabajo fue realizado en las instalaciones de la Universidad Politécnica de Valencia. Se utilizaron hembras provenientes de dos líneas de selección, la línea A de origen Neozelandés blanco seleccionada desde 1980 durante 39 generaciones por tamaño de camada al destete mediante un índice de selección familiar, y la línea sintética R seleccionada desde 1992 durante 25 generaciones por crecimiento post-destete mediante un índice individual (28-63 días, Estany *et al.*, 1992).



Figura 3.1. Fotografía de hembras de cada una de las líneas de selección objeto de estudio con sus respectivas camadas.

3.2. Experimento 1. Caracterización de parámetros reproductivos.

3.2.1. Manejo reproductivo.

Se utilizaron 116 hembras adultas de más de dos partos provenientes de dos líneas de selección, la línea A (n=55) y la línea sintética R (n=61). Cada una de las hembras utilizadas para este trabajo experimental, fueron montadas como mínimo en dos ocasiones por machos de fertilidad probada pertenecientes a su misma línea de selección y asignados a cada una de las hembras atendiendo a su genealogía, y siguiendo, por tanto, el manejo habitual en el marco del programa de selección.

3.2.2. Laparoscopia de diagnóstico gestacional.

Se realizaron, desde octubre hasta mayo de 2009, un total de 154 laparoscopias a los 12 días post-monta con el fin de observar la tasa de ovulación y el número de embriones implantados (en desarrollo o en regresión). A las conejas se les inyectó intramuscularmente 0,5 mL de una solución al 2% de Clorhidrato de xilacina [(clorhidrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina, Rompún, Bayer]. Tras 5 minutos, las conejas recibían vía venosa 2 mL de una solución de ketamina (Imalgene, 50mg/mL). Las conejas se situaban decúbito supino sobre un potro inclinado 45°. Se preparaba el campo de intervención, pelando las zonas de inserción de trócares y vainas, lavando y desinfectando las mismas con una solución de yodo. Una vez distendido el abdomen mediante la introducción de CO₂ con una cánula de Verres, se realizaban dos punciones a 6-8 cm. por debajo del extremo del esternón entre el segundo y tercer par de mamas, con los trocares y vainas correspondientes al laparoscopio y a la sonda de palpación (5mm. de diámetro). Tras la intervención, se desinfectaban las heridas con una solución de yodo y se aplicaba un spray acrílico para proteger las heridas. Se les administraba 1 mL de antibiótico que contenía penicilina G sódica (75.000 UI), penicilina G procaína (175.000UI) y sulfato de dihidroestreptomicina (312,5 mg) (Penivet 1, Divasa Farmavic, S.A., Barcelona, España) para evitar complicaciones posteriores derivadas de la cirugía y, pasados 30 minutos de post-operatorio, la coneja era devuelta a su jaula.

3.2.3. Obtención de suero sanguíneo.

La obtención de suero sanguíneo se realizó a un total de 30 hembras multíparas de la línea R y 40 hembras de la línea A a los 12 días de gestación. Para ello, se extrajo sangre de la vena central de la oreja mediante un tubo Vacutainer heparinizado. Posteriormente, estos tubos se centrifugaron a 3000 g durante 10 min. con el fin de separar el suero, que se congeló a -80°C para su posterior análisis.

3.2.4. Cuantificación de los niveles de progesterona sérica.

El análisis de las muestras de suero obtenido de las conejas se realizó mediante una técnica de ELISA en ensayo directo. Se analizaron en cada una de las placas dos controles, de 2,5 y 10 ng/mL, además de las muestras estándar con rango de entre 0 y 30 ng/mL, con el fin de obtener una recta de calibrado y conocer la cantidad de antígeno, en nuestro caso, progesterona

(esteroide C21, pregn-4-ene-3,20 diona) presente en las muestras problema. Finalmente, se midió la densidad óptica (DO) a 450 nm, que es la medida donde emite color el sustrato TMB (tetrametilbenzidina) para el enzima utilizado, en nuestro caso, la peroxidasa de rábano. La sensibilidad de esta técnica de ELISA en ensayo directo es de 0,1 ng/mL.

Para ello, se incubaron 50 μ L de cada una de las muestras de suero junto con 100 μ L del enzima conjugado (peroxidasa de rábano) durante 1 hora a 37°C. Después de realizar 5 lavados de las placas, se añadieron 100 μ L de TMB y se incubó otros 10 min. a temperatura ambiente (18-28°C). Posteriormente, se añadieron 50 μ L de solución de Parada de la reacción (Rabbit Progesterone Elisa Test, Endocrine Technologies, Inc. Newark, USA). Finalmente, se leyó la absorbancia a 450 nm mediante el sistema VICTOR^{XTM} Multilabel Plate Readers (Perkin Elmer, USA).



Figura 3.2.1. Detalle del momento de realización del método Elisa para cuantificar niveles séricos de progesterona.

3.2.5. Análisis estadístico.

El análisis de las características reproductivas estudiadas para cada una de las líneas, tasa de ovulación (TO) como número de cuerpos lúteos contados en los dos ovarios de la hembra en el momento de realizar la laparoscopia, número de embriones implantados (EI) como número de embriones implantados en los cuernos uterinos y contados en el momento de realizar la laparoscopia, número de nacidos totales (NT) y número de nacidos vivos (NV) y, para los niveles de progesterona sérica (Prog), se realizó un modelo lineal general en el que se incluyeron los efectos fijos línea (A y R), lactación (lactante y no lactante) y su interacción. La tasa de ovulación se incluyó como covariable en el análisis del número de embriones implantados y niveles séricos de progesterona, y el número de embriones implantados se incluyó

como covariable en el análisis del número de nacidos totales y nacidos vivos, así como para el análisis de los niveles de progesterona:

Para el análisis de la inducción de la ovulación se realizó una regresión logística en la que se incluyeron como efectos fijos la línea y el estado de lactación, además de la interacción entre ambos. Los modelos utilizados para los análisis estadísticos fueron los siguientes:

$$\text{Tasa de Ovulación: } y_{ijk} = \mu + \text{Línea}_i + \text{Lactación}_j + (\text{Línea} * \text{Lactación}) + \varepsilon_{ijk}$$

$$\text{Embriones Implantados: } y_{ijk} = \mu + b * \text{TO} + \text{Línea}_i + \text{Lactación}_j + (\text{Línea} * \text{Lactación}) + \varepsilon_{ijk}$$

$$\text{Nacidos Vivos: } y_{ijk} = \mu + b * \text{EI} + \text{Línea}_i + \text{Lactación}_j + (\text{Línea} * \text{Lactación}) + \varepsilon_{ijk}$$

$$\text{Nacidos Totales: } y_{ijk} = \mu + b * \text{EI} + \text{Línea}_i + \text{Lactación}_j + (\text{Línea} * \text{Lactación}) + \varepsilon_{ijk}$$

$$\text{Niveles de Progesterona: } y_{ijk} = \mu + b * \text{TO} + \text{Línea}_i + \text{Lactación}_j + (\text{Línea} * \text{Lactación}) + \varepsilon_{ijk}$$

$$y_{ijk} = \mu + b * \text{TO} + \text{Línea}_i + \text{Lactación}_j + (\text{Línea} * \text{Lactación}) + \varepsilon_{ijk}$$

$$\text{Inducción de Ovulación: } y_{ij} = e^{b / (1 + e^b)},$$

$$\text{siendo } b = \alpha_0 + \text{Línea}_i + \text{Lactación}_j + (\text{Línea} * \text{Lactación})$$

Por último, se realizó un test de Fisher con el fin de detectar posibles diferencias entre las pérdidas totales tanto pre- (hembras ovuladas pero con ningún embrión implantado) como post-implantaciones (hembras con embriones implantados pero sin nacidos totales) para los efectos fijos estudiados. Se consideraron como significativos los resultados cuyo valor P fue menor de 0,05 (intervalo de confianza del 95%) para todos los análisis realizados. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete estadístico Statgraphics 5.1.

3.3. Experimento 2. Expresión génica en blastocistos de 5 y 6 días de las líneas A y R.

3.3.1. Obtención de blastocistos.

Las hembras núlparas utilizadas para este experimento fueron inseminadas mediante mezclas heterospérmicas de machos con fertilidad probada de cada una de las líneas, recuperadas mediante vagina artificial y diluidas 1:5 en una solución TRIS-Cítrico-glucosa habitual para el semen de esta especie. La ovulación fue inducida inmediatamente después de la inseminación artificial mediante una inyección intramuscular de 1 µg de acetato de buserelina.

La recuperación de los blastocistos se realizó mediante laparoscopia a los 5 y 6 días post-inseminación siguiendo el procedimiento básico de laparoscopia descrito anteriormente con las modificaciones que se detallan a continuación. En esta intervención, la sonda de palpación se

sustituye por un fórceps atraumático de 5 mm. de diámetro con la final de sujetar los úteros a nivel de la unión útero-tubárica. Además, mediante una vaina y aguja epidural, se atraviesa la pared abdominal y cada uno de los cuernos uterinos, que se perfunden con 50 mL de medio de recuperación (PBS+BSA al 3%). La perfusión es recogida del fondo de la vagina con un catéter de Foley de dos vías conectado a una bomba de aspiración. Finalizada la recuperación, se desinfectan las heridas con una solución de yodo y se aplica un spray acrílico para proteger las heridas. Tras 30 minutos de post-operatorio, las hembras son devueltas a su jaula.

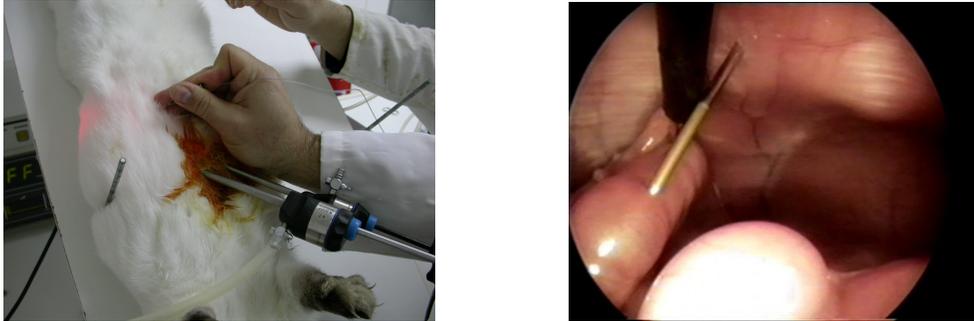


Figura 3.3.1a. Detalles del momento de realización de laparoscopia en el que se introduce la cánula de perfusión.

Una vez recuperados los embriones, se evalúan y catalogan bajo lupa binocular para, posteriormente, ser guardados en medio de preservación de ARN (RNA Later®) a -80°C . Sólo se utilizaron para el análisis los embriones con tamaños de entre 1200 y 1800 μm . para los blastocistos recuperados a los 5 días (figura 3.3.1), y de entre 3400 y 4800 μm . para los blastocistos recuperados a los 6 días post-inseminación. Se recuperaron embriones a 5 días de un total de 22 hembras (8 hembras de la línea A y 14 de la línea R) y a 6 días de un total de 19 hembras (8 hembras de la línea A y 11 de la línea R).

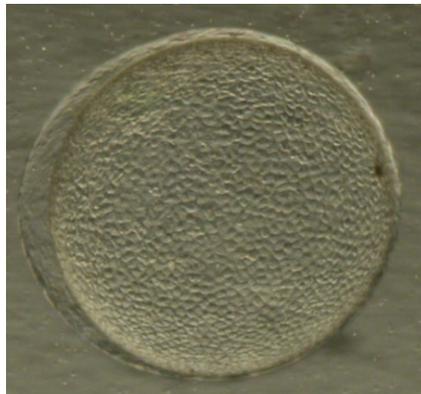


Figura 3.3.1b. Fotografía de blastocisto recuperado a los cinco días de gestación.

3.3.2. Obtención de ARN mensajero y ADN complementario.

Se extrajo el ARN mensajero total de los blastocistos recuperados de cada una de las hembras utilizando Trizol® y según las instrucciones del fabricante. Este ARN total se eluyó en un volumen final de 10 µL. Se evaluó la calidad y cantidad del ARN extraído mediante el cálculo del ratio de absorbancias a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro y dando como válidos aquellos ARN que presentaron concentraciones de entre 20 y 30 ng/µL, y ratios iguales o superiores a 1,8. Posteriormente, las muestras se trataron con enzima DNAsa para evitar contaminaciones con ADN y se incubaron a 42°C durante 2 minutos con el fin de inactivar la enzima. Se procedió a realizar la transcripción reversa, añadiendo a las muestras una enzima con actividad transcriptasa reversa y cebadores aleatorios con una incubación posterior de 15 minutos a 42°C para activar la enzima y facilitar la unión de los cebadores. Finalmente, se inactivó la reacción mediante la incubación de las muestras a 95°C durante 3 minutos. El ADN complementario obtenido se guardó a -20°C hasta su utilización.

3.3.3. Cuantificación por PCR en Tiempo Real.

La cuantificación relativa de los genes objeto de estudio se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real (PCR) con el termociclador modelo 7500 de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los cebadores específicos para amplificar cada uno de los transcritos se diseñaron mediante la obtención previa de parte de sus secuencias en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y posterior diseño de los mismos mediante el software Primer3 (SourceForge). Este diseño se llevó a cabo con una serie de restricciones para asegurar la especificidad de los cebadores diseñados. Las secuencias extraídas de GenBank, junto con los cebadores utilizados y el tamaño de amplificado obtenido se muestran en la tabla 3.3.3.

Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado para cada una de las muestras, con un volumen de reacción total de 50 µL, que consistía en 25 µL de Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 25 µM de cada uno de los cebadores específicos y de 1 a 10 ng de ADN complementario. El protocolo de PCR consistió en un paso inicial de activación de la enzima ADN polimerasa de 50°C durante 2 minutos y un segundo paso de desnaturalización de 95°C durante 15 segundos. Posteriormente, se sometió a las muestras a 45 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60 segundos a la temperatura de unión específica de los cebadores de

cada uno de los genes a amplificar y finalmente, una etapa de extensión final a 72°C durante 60 segundos, donde se realizaba la medida de fluorescencia. Además, se añadió una curva de fusión (melting curve) que consistía en la medida constante de fluorescencia durante una rampa de temperaturas de entre 60 y 95°C durante 20 minutos. Esta medida constante de fluorescencia asegura que la amplificación de cada gen es específica y correcta, ya que al realizar una rampa de temperaturas se consigue separar todas las hebras de ADN que se han amplificado cuando se alcanza la temperatura concreta de disociación del gen amplificado. De esta forma, si la PCR se ha realizado de forma específica y sólo se ha amplificado el gen diana, se obtiene una única medida de fluorescencia máxima a una temperatura concreta, la temperatura de disociación de la doble hélice de ADN para ese transcrito concreto. De esta forma, se comprueba y verifica la existencia de un único producto de amplificación (figura 3.3.3).

Gen	Secuencia de los cebadores utilizados	Código en GenBank de la secuencia (Accesión Number GenBank)	Tamaño amplificado (pb)
Oct4 (POU5F1)	5'-CATGAGCAGCAAGGAAAAC-3' 5'-GGGCGATGAACCATACCG-3'	NM001099957	231
Subunidad β_3 de Integrina	5'-CTCCACCACCATGGATTACC-3' 5'-AGGATGTTGCTGGAGTTGGT-3'	AF309685	173
IFN ω_{48}	5'-AGCCAGAATGCCTTCAGAGA-3' 5'-CAGAGTTGTGAGGGCAGGTCA-3'	S68999	174
INF γ	5'-GTCTGCATTCTGAGCCACTG-3' 5'-ATTCAGGGGAGTCACAGTT-3'	NM001081991	151
VEGF	5'-CTACCTCCACCATGCCAAGT-3' 5'-CACACTCCAGGCTTTCATCA-3'	AY196796	236
erbB3	5'-GTCACATGGACACGATCGAC-3' 5'-AAAGAGTGCCCGTTACTACT-3'	AF333179	191
TGF- β	5'-GACCCCACATCTCCTGCTAA-3' 5'-CACCCAAGATCCCTCTTGAA-3'	NM001082660	165
β -actina	5'-CACACGGTGCCCATCTACG-3' 5'-GCCATCTCCTGCTCGAAGTC-3'	AF000313	203

Tabla 3.3.3. Cebadores específicos, secuencias de GenBank utilizadas para el diseño de éstos y tamaño del fragmento amplificado de cada uno de los transcritos analizados (Oct4 como transcrito del gen POU1F, subunidad β_3 de la Integrina, Interferones ω_{48} y γ (IFN- ω_{48} and IFN- γ), VEGF como Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular, erbB3 como Receptor 3 del Factor de Crecimiento Epidérmico, TGF- β como Factor de Crecimiento Transformante β y β -actina como gen de referencia (housekeeping) utilizado.

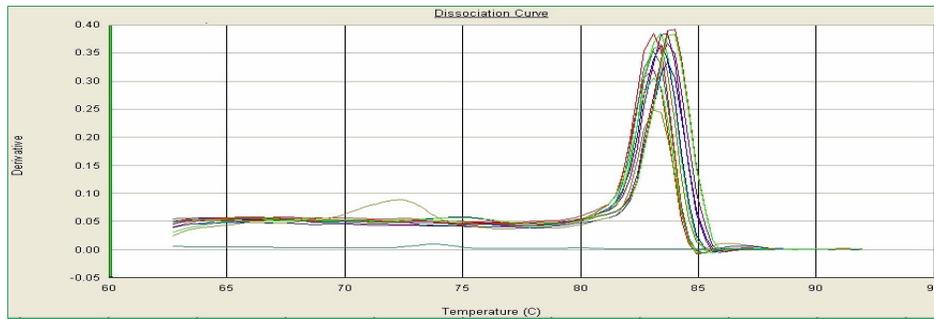


Figura 3.3.3. La curva de fusión o melting curve indica la especificidad del producto amplificado. Si se ha amplificado un solo producto en la reacción de PCR, se observa un único pico, correspondiente a la temperatura de fusión de dicho producto de PCR.

3.3.4. Análisis de datos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.

Para el análisis de los datos obtenidos mediante PCR en Tiempo Real, se realizó el cálculo del valor $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para cada una de las muestras (Livak and Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001). En este trabajo en concreto, se utilizó como gen de referencia el gen de la β -actina. Una vez realizada la medición del gen de referencia y del gen diana, se calcula el ΔC_t , que será la diferencia entre los C_t (ciclo umbral) obtenidos para el gen de referencia y los obtenidos para el gen diana para cada una de las muestras. Una vez realizado esto, se calcula el $\Delta\Delta C_t$, que será el valor calculado anteriormente y referenciado a un grupo control (calibrador). En nuestro caso, dado que las muestras provenían de dos líneas de selección distintas y a dos días de recuperación post-inseminación diferentes, se utilizó como valor de referencia o calibrador, el grupo que presentaba el mayor valor medio de ΔC_t para cada uno de los genes estudiados. Finalmente, la expresión relativa del gen se expresa como el logaritmo en base 10 de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ con el fin de normalizar los datos.

3.3.5. Análisis estadístico.

El efecto de la línea y la edad de los blastocistos sobre el porcentaje de muestras que presentaban expresión para cada uno de los genes fueron estudiados mediante un test de chi-cuadrado con corrección de Yates. Para el análisis de expresión génica relativa se utilizó un modelo lineal general en el que se incluyeron los factores línea y edad del blastocisto como

efectos fijos, además de su interacción. Se calcularon las correlaciones de Pearson para los resultados de expresión relativa por pares de genes estudiados, considerando como significativos los resultados cuyo valor P fue menor de 0,05 (intervalo de confianza del 95%) para todos los análisis realizados. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete estadístico Statgraphics 5.1.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS.

4.1. Experimento 1. Caracterización de parámetros reproductivos.

4.1.1. Inducción de la ovulación, tasa de ovulación, número de embriones implantados y tamaño de camada.

En las 154 laparoscopias realizadas (86 de la línea R y 68 de la línea A), un 54,7% de las hembras de la línea R ovularon frente al 83,8% de las hembras de la línea A (tabla 4.1). Por estados de lactación, también hubo diferencias significativas entre hembras para el parámetro inducción de la ovulación, siendo de un 75,2% el porcentaje de hembras lactantes frente al 51% de hembras no lactantes (tablas 4.1a y 4.1b). La interacción línea-lactación no fue significativa.

La tasa de ovulación en las 104 conejas que habían ovulado (47 de la línea R y 57 de la línea A), fue similar entre las dos líneas y para los estados de lactación ($14,1 \pm 0,30$ vs $13,9 \pm 0,39$ para las líneas A y R, respectivamente, y $14,2 \pm 0,30$ vs $13,9 \pm 0,56$ para lactantes y no lactantes, tabla 4.1a). Tampoco fue significativa la interacción entre los factores fijos analizados.

Sin embargo, se observó un efecto significativo de la línea sobre el número de embriones implantados el día 12 de gestación (93 conejas). Éstos fueron de $11,4 \pm 0,43$ para la línea R (37) y de $13,0 \pm 0,41$ para la línea A (56) (tabla 4.1.2a). El factor estado de lactación no fue significativo y tampoco la interacción línea-lactación. La introducción de la covariable tasa de ovulación ($0,7 \pm 0,08$) no modificó la significación, ni para los factores ni para su interacción (tabla 4.1.2b). Respecto a las pérdidas totales pre-implantacionales, tan sólo una de las conejas de la línea A no presentó embriones implantados después de haber ovulado (1,8%) frente a 10 hembras de la línea R (21,2% de las que habían ovulado, $P < 0,05$).

El análisis de la variable tamaño de camada, incluyendo o no el número de embriones implantados como covariable, mostró diferencias tanto en el número de nacidos totales como en el número de nacidos vivos entre las dos líneas, pero no para el estado de lactación ni para la interacción línea-lactación. La línea A presentaba un número total de nacidos de $10,9 \pm 0,47$ ($n=53$) y $10,3 \pm 0,49$ de nacidos vivos, mientras que la línea R presentaba un número de nacidos totales de $7,0 \pm 0,56$ ($n=26$) y $6,3 \pm 0,60$ de nacidos vivos ($P < 0,05$, tabla 4.1.2a). Respecto a las

pérdidas totales post-implantacionales, once hembras gestantes de la línea R (29,7% de las gestantes) y tres de la línea A (5,3% de las gestantes, $P < 0,05$) no llegaron a parto, asumiendo un reabsorción total de los embriones implantados tras comprobar por palpación abdominal la no retención de feto alguno a los 34 días desde la monta. Los estados de lactación analizados no influyeron sobre esta variable.

4.1.2. Análisis de niveles séricos de progesterona.

Se analizaron los niveles séricos de progesterona (ng por mL de suero) a los 12 días de gestación para un total de 40 hembras de la línea A y para 30 hembras de la línea R tanto lactantes ($n=55$) como para no lactantes ($n=15$) que hubieran ovulado. Los niveles de progesterona para ambas líneas y estados de lactación no fueron diferentes, siendo de $11,9 \pm 1,50$ para la línea R, y de $9,9 \pm 1,67$ para la línea A y de $10,1 \pm 1,05$ para lactantes y $11,7 \pm 1,99$ para no lactantes (tabla 4.1.2a). Al introducir como covariables la tasa de ovulación o el número de embriones implantados, los resultados obtenidos para los factores línea y estado de lactación no se modificaron, no siendo significativos, al igual que tampoco lo fue su interacción (tabla 4.1.2b).

		n	IO (%)	TO LSM ± ES	EI LSM ± ES	NT LSM ± ES	NV LSM ± ES	n*	Prog LSM ± ES
LINEA	A	68	83,8*	14,1 ± 0,30	13,0 ± 0,41*	10,9 ± 0,47*	10,3 ± 0,49*	40	9,9 ± 1,67
	R	86	54,7*	13,9 ± 0,39	11,4 ± 0,43*	7,0 ± 0,56*	6,3 ± 0,60*	30	11,9 ± 1,50
ESTADO	Lactante	105	75,2*	14,2 ± 0,30	12,8 ± 0,30	9,3 ± 0,38	8,4 ± 0,40	55	10,1 ± 1,05
	No lactante	49	51,0*	13,9 ± 0,53	11,6 ± 0,56	8,6 ± 0,70	8,2 ± 0,73	15	11,7 ± 1,99
TOTAL		154	67,5	14,0 ± 0,30	12,2 ± 0,32	9,0 ± 0,39	8,3 ± 0,42	70	10,9 ± 1,09

Tabla 4.1.2a. En la tabla se muestran los resultados obtenidos sin incluir covariables para las variables reproductivas estudiadas para cada uno de los efectos incluidos en el modelo, línea (A, R) y lactación (lactante, no lactante). IO: inducción de la ovulación, TO: tasa de ovulación, EI: número de embriones implantados a los 12 días de gestación, NT: número de nacidos totales, NV: número de nacidos vivos y Prog: niveles séricos de progesterona a los 12 días de gestación. LSM ± ES: medias ajustadas por mínimos cuadrados ± error estándar, n: datos analizados para IO, TO, EI, NT y NV, n*: datos analizados para Prog. Datos estadísticamente significativos marcados con asterisco por factor analizado.

		n	EI LSM ± ES	NT LSM ± ES	NV LSM ± ES	n*	Prog	
							Cov. TO LSM ± ES	Cov. EI LSM ± ES
LINEA	A	56	13,2 ± 0,30*	10,8 ± 0,42*	10,2 ± 0,47*	40	10,0 ± 1,65	10,1 ± 1,69
	R	37	11,4 ± 0,31*	7,9 ± 0,54*	7,0 ± 0,61*	30	12,0 ± 1,49	11,5 ± 1,61
ESTADO	Lactante	73	12,7 ± 0,22	9,4 ± 0,34	8,4 ± 0,38	55	9,9 ± 1,04	10,1 ± 1,05
	No lactante	20	12,0 ± 0,41	9,4 ± 0,64	8,8 ± 0,71	15	12,1 ± 1,98	11,4 ± 2,03
TOTAL		93	12,3 ± 0,23	9,4 ± 0,36	8,6 ± 0,41	70	11,1 ± 1,08	10,8 ± 1,11
Estima de la covariable			0,69 ± 0,079 (TO)	0,49 ± 0,114 (EI)	0,37 ± 0,126 (EI)		0,58 ± 0,368	-0,23 ± 0,296

Tabla 4.1.2b. En la tabla se muestran los resultados obtenidos para las variables reproductivas estudiadas para cada uno de los efectos incluidos en el modelo, línea (A, R) y lactación (lactante, no lactante). EI: número de embriones implantados a los 12 días de gestación incluyendo la tasa de ovulación como covariable en el análisis, NT: número de nacidos totales y NV: número de nacidos vivos, incluyendo el número de embriones implantados como covariable en ambos análisis, Prog: niveles séricos de progesterona a los 12 días de gestación, analizados incluyendo como covariable tanto la tasa de ovulación (Cov. TO), como el número de embriones implantados (Cov. EI), LSM ± ES: medias ajustadas por mínimos cuadrados ± error estándar, n: datos analizados para IO, TO, EI, NT y NV, n*: datos analizados para Prog. Datos estadísticamente significativos marcados con asterisco por efecto analizado

4.2.- Experimento 2: Expresión génica en blastocistos de 5 y 6 días de las líneas A y R.

4.2.1. Eficiencia de la PCR en Tiempo Real.

Para todos los genes objeto de estudio, se realizaron las curvas de fusión (melting curves) al final de cada reacción de PCR. La especificidad de los productos de PCR amplificados se confirmó por la presencia de un único pico de fluorescencia en estas curvas. Los coeficientes de correlación para la expresión relativa de cada uno de los genes estudiados presentó una variación de entre 0,95 a 0,99 y las eficiencias (E) de las reacciones de PCR oscilaron entre 1,93 a 2,21, calculadas mediante la ecuación $E = 10^{(-1/\text{slope})}$. Los coeficientes de variación interplaca fueron de entre 0,92 y 6,74% (tabla 4.2.1).

Gen	Pendiente o Slope (m)	Intercept (b)	Eficiencia (E)	Coefficiente de Correlación (r^2)	Coefficiente de Variación (CV %)
β -actin	-3,42	20,65	1,96	0,99	3,32
Oct-4	-2,94	29,15	2,18	0,96	2,78
β 3-Integrina	-3,10	29,63	2,10	0,95	0,92
IFN γ	-3,51	30,28	1,93	0,98	3,88
IFN ω_{48}	-2,89	35,09	2,21	0,97	3,38
VEGF	-3,43	30,27	1,96	0,99	3,66
erbB3	-3,33	26,59	1,99	0,99	6,74
TGF- β	-3,04	32,29	2,14	0,99	1,24

Tabla 4.2.1. En la tabla se muestra información relativa a las curvas de cuantificación relativa y eficiencias de las reacciones de PCR, además de los coeficientes de variación intraplaca para cada uno de los genes estudiados: β 3-Integrina como subunidad β 3 de Integrina, IFN- γ y IFN- ω_{48} como Interferón γ y ω_{48} respectivamente, VEGF como Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular, erbB3 como Receptor 3 del Factor de Crecimiento Epidérmico, TGF- β como Factor β de Crecimiento Transformante y el gen de referencia (housekeeping) utilizado gene (β -actin). Los valores de la pendiente, eficiencia y correlación se han obtenido directamente del Termociclador de PCR en Tiempo Real. Las eficiencias de las reacciones de PCR se han calculado mediante la fórmula $E=10^{(-1/\text{slope})}$.

4.2.2. Análisis de la expresión génica.

Se obtuvo la expresión de todos de los genes sometidos a estudio a partir del ARN extraído de 5 blastocistos de cada una de las hembras. La subunidad $\alpha\beta$ 3 del gen de la integrina presentó expresión en un bajo número de blastocistos recuperados en el día 5 post-inseminación mientras que, prácticamente, todos los blastocistos recuperados en el día 6

presentaban expresión de dicho gen (54,5% versus 95,5%, figura 4.2.2a). No se observaron diferencias en los porcentajes de expresión entre líneas (figura 4.2.2a).

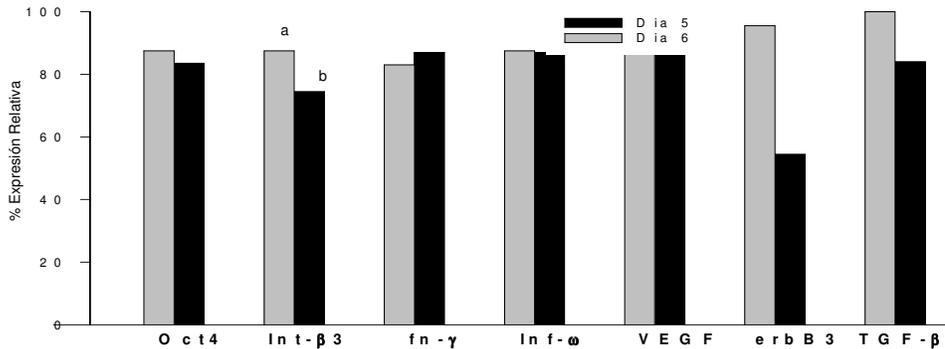


Figura 4.2.2a. Porcentaje de blastocistos de diferentes edades que expresan los genes estudiados: Oct4, subunidad -β3 de Integrina (Int-β3), Interferón γ (Ifn-γ), Interferón ω48 (Ifn-ω), Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), Receptor 3 del Factor de Crecimiento Epidérmico (erbB3) y Factor β de Crecimiento Transformante (TGF-β) en diferentes etapas de desarrollo embrionario (días 5 y 6 post-inseminación). Barras con diferentes letras en los valores de cada transcrito indican que éstos difieren significativamente ($P < 0,05$).

La expresión relativa de Oct4, TGF-β y la subunidad de integrina estudiada no fue significativamente distinta en blastocistos recuperados el día 5 respecto a los recuperados el día 6. Sin embargo, la expresión relativa de genes relacionados con la neovascularización (VEGF y erbB3) sí fue diferente según la edad de los blastocistos. Los valores de expresión relativa para el VEGF fueron de $0,86 \pm 0,17$ vs $0,12 \pm 0,15$ para blastocistos recuperados en el día 5 y 6 respectivamente, mientras que para el erbB3 fueron de $0,72 \pm 0,13$ vs $0,02 \pm 0,14$ para los días 5 y 6 respectivamente (figura 4.2.2b). De la misma forma, tanto el Interferon γ como el ω presentaron un incremento de su expresión en blastocistos de 5 días frente a los de 6 días. Los resultados medios de expresión relativa obtenidos para el Interferon γ fueron de $1,69 \pm 0,30$ vs $0,19 \pm 0,32$, y para el Interferon ω fueron de $1,81 \pm 0,27$ vs $0,40 \pm 0,29$ para los días 5 y 6, respectivamente (figura 4.2.2b).

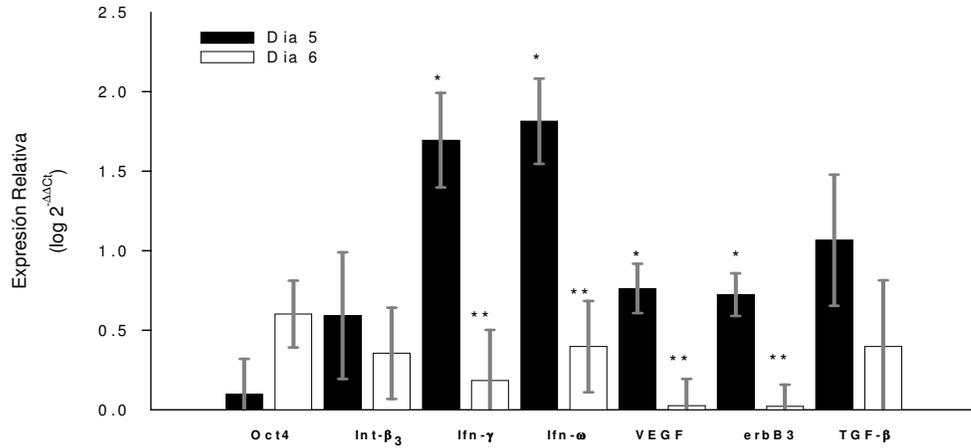


Figura 4.2.2b. Expresión relativa de ARN mensajero de todos los genes estudiados en diferentes momentos de desarrollo embrionario: Oct4, subunidad 3 de Integrina (Int-β₃), Interferón γ (Ifn-γ), Interferón ω48 (Ifn-ω), Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), Receptor 3 del Factor de Crecimiento Epidérmico (erbB3) y Factor β de Crecimiento Transformante (TGF-β) en diferentes etapas de desarrollo embrionario (días 5 y 6 post-inseminación). Barras con asterisco (* y **) en los valores de cada transcrito indican que éstos difieren significativamente ($P < 0,05$). Los valores se muestran como la media ± SEM.

La expresión relativa de cada gen estudiado no presentó diferencias estadísticamente significativas entre blastocistos recuperados de hembras pertenecientes a las dos líneas de selección objeto de estudio (figura 4.2.2c)

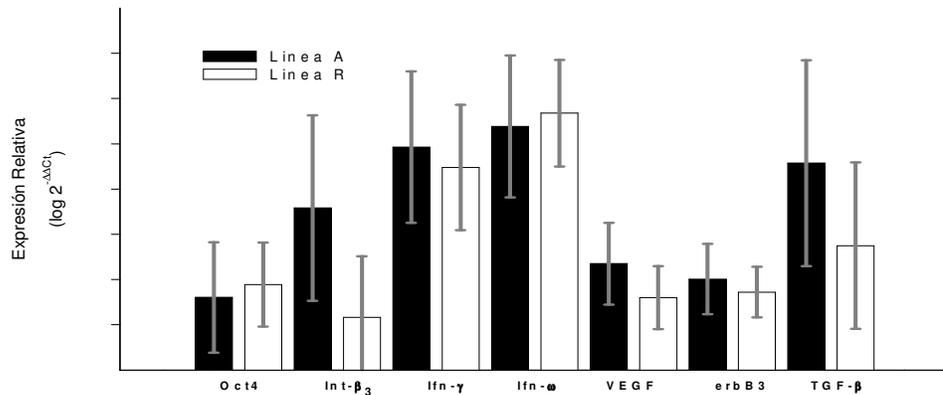


Figura 4.2.2c. Expresión relativa de todos los genes estudiados en las dos líneas de selección: Oct4, subunidad β₃ de Integrina (Int-β₃), Interferón γ (Ifn-γ), Interferón ω48 (Ifn-ω), VEGF como Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular, erbB3 como Receptor 3 del Factor de Crecimiento Epidérmico y TGF-β como Factor de Crecimiento Transformante β.

En el análisis de las correlaciones entre la expresión relativa de los genes estudiados, se observó una correlación negativa entre Oct4 y genes relacionados con la neovascularización (VEGF y erbB3). Por el contrario, otros genes estudiados presentaron una correlación positiva entre sus niveles de expresión relativa, de forma que presentaron correlaciones positivas el Oct4 respecto a la subunidad $\alpha V\beta 3$ de la Integrina, el Interferón γ y con el Interferón $\omega 48$, VEGF y erbB3, Interferón $\omega 48$ con VEGF y erbB3, y por último, VEGF con erbB3 (tabla 4.2.2).

	Integrina β_3	IFN γ	IFN $\omega 48$	VEGF	erbB3	TGF- β
Oct-4	R = 0,6069* (P = 0,0035)	R = -0,3655 (P = 0,1033)	R = -0,2737 (P = 0,2300)	R = -0,5642* (P = 0,0077)	R = -0,4389* (P = 0,0465)	R = -0,2496 (P = 0,2753)
Integrina β_3		R = 0,3883 (P = 0,0820)	R = 0,3287 (P = 0,1457)	R = -0,0228 (P = 0,9218)	R = 0,2772 (P = 0,2238)	R = -0,0114 (P = 0,9607)
IFN γ			R = 0,6153* (P = 0,0030)	R = 0,5452* (P = 0,0106)	R = 0,7214* (P = 0,0002)	R = 0,3876 (P = 0,0826)
IFN $\omega 48$				R = 0,4689* (P = 0,0320)	R = 0,5335* (P = 0,0127)	R = -0,0201 (P = 0,9310)
VEGF					R = 0,5166* (P = 0,0165)	R = 0,4061 (P = 0,0677)
erbB3						R = 0,1729 (P = 0,4534)

Tabla 4.2.2. Correlaciones de Pearson entre la expresión relativa (expresada como el logaritmo en base 10 de $2^{-\Delta\Delta Ct}$) de los genes estudiados: Oct4, subunidad β_3 de Integrina (Integrin β_3), Interferón γ (Ifn- γ), Interferón $\omega 48$ (Ifn- $\omega 48$), VEGF como Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular, erbB3 como Receptor 3 del Factor de Crecimiento Epidérmico y TGF- β como Factor de Crecimiento Transformante β . La tabla muestra los coeficientes de correlación y los valores de P de esta correlación por parejas de genes. Las correlaciones estadísticamente significativas se indican con asterisco (*).

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN.

La selección por criterios productivos es habitual en diferentes especies pero los animales seleccionados por este criterio suelen presentar, al cabo de un número determinado de generaciones de selección, deficiencias en sus características reproductivas, fenómeno observado en diferentes especies de mamíferos como cerdos, ratones y conejos (Torres *et al.*, 1987; Bolet y Theau-Clément, 1994; Wilson *et al.*, 1998; Ernst *et al.*, 2000). En este trabajo se han estudiado los principales parámetros reproductivos de una línea de conejo seleccionada por velocidad de crecimiento (R), que presenta menores tamaños de camada que otras líneas de conejo maternales (como las líneas A ó V), pese a que, en estudios previos se ha podido observar que tanto su tasa de ovulación como el número de embriones en estadio de mórula o blastocisto temprano a las 72 horas de gestación son similares en estas líneas (Mehaisen *et al.*, 2004).

La inducción de la ovulación en el conejo es un proceso en el que el desarrollo folicular, la coordinación neuro-endocrina y el comportamiento sexual confluyen, generalmente, para hacer de esta especie, una especie eficaz desde el punto de vista reproductivo. Pese a ser utilizada en un manejo reproductivo tradicional (las hembras con signos de receptividad son llevadas a la jaula del macho y, tras al menos dos montas efectivas, devueltas a sus jaulas), en la línea R tan sólo un 54,7% de las hembras ovularon, porcentaje muy por debajo del que se obtuvo en las hembras de la línea A en las mismas condiciones de manejo reproductivo (83,8%). Estos fallos de inducción de la ovulación en la línea R podrían deberse, por un lado, a una insuficiente sensibilidad hipotalámica-hipofisaria al 17β -estradiol, o bien, a causa de un deficiente reflejo neuroendocrino que provoque la secreción de GnRH y la correspondiente descarga hipofisaria de FSH/LH. Por otro lado, la menor tasa de inducción de la ovulación observada también podría ser debida a anomalías o deficiencias en el desarrollo folicular, que podrían sugerir la falta de receptores LH o la incapacidad de éstos para recibir la señal endocrina. Sin embargo, cuando las conejas de la línea R han sido utilizadas como donantes del banco de embriones, siendo para ello inseminadas de modo artificial e induciendo la ovulación con análogos sintéticos de GnRH, no se han observado hasta el momento fallos tan relevantes y significativos en la inducción de la ovulación por lo que, inicialmente, puede descartarse que los fallos reproductivos de inducción de la ovulación sean por problemas en los receptores de LH y centrarse en factores que interfieran la actividad hipofisaria, como el Factor de Crecimiento de

tipo Insulina I (IGF-1) (Navarrete Santos *et al.*, 2008), la hormona leptina (Shen *et al.*, 2007) y otros factores relacionados con la esteroidogénesis (Schmidt *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos muestran que la tasa de ovulación fue similar en las líneas objeto del estudio (A y R) y para los dos niveles de lactación estudiados (lactante y no lactante). Kermabon *et al.* (1994) observaron que el efecto de la lactación no afectaba a la tasa de ovulación, aunque sí a la receptividad. Otros autores han mostrado que la inducción de la ovulación es menor si la hembra está en periodo de lactación en el momento de la monta. De hecho, se ha demostrado que niveles elevados de prolactina tienen un efecto inhibitorio sobre la inducción de la ovulación, disminuyendo el número de ovocitos producidos por el ovario (Hamada *et al.*, 1980; Lin *et al.*, 1988; Yoshimura *et al.*, 1992). Sin embargo, nuestros resultados muestran un efecto positivo de la lactación respecto a la inducción de la ovulación. Fortun-Lamothe y Prunier (1999) estudiaron la relación entre lactación, balance energético y ovulación. Sus resultados muestran que no existen diferencias en la tasa de ovulación entre hembras lactantes y no lactantes en sistemas reproductivos semi-intensivos, aunque sí observaron un efecto de la lactación sobre la receptividad y, por tanto, sobre el desarrollo folicular y la esteroidogénesis. Los resultados obtenidos en este trabajo respecto a la tasa de ovulación concuerdan con estos datos, ya que no se observó efecto de la lactación

Por otro lado, el efecto línea resultó significativo para el número de embriones implantados en el día 12 de gestación, de forma que hembras de la línea R presentaron un menor número de embriones implantados que la línea A, resultados que no varían al incluir la tasa de ovulación como covariable en el análisis. Estos resultados muestran que la línea R presenta una menor supervivencia embrionaria que la línea A, que implanta una media de 2,19 embriones más (lo que representa un 94% de supervivencia embrionaria, frente al 81% de la línea R). Diferencias en la supervivencia embrionaria de líneas de conejo ya habían sido observadas en líneas de selección divergente por alta y baja capacidad uterina (Mocé *et al.*, 2004), donde se observaron supervivencias embrionarias mayores en las líneas seleccionadas por alta capacidad uterina.

Por otro lado, la lactación no tuvo ningún efecto sobre el número de embriones implantados. En este sentido, existen resultados dispares en la bibliografía. Fortun-Lamothe *et al.* (1993) no observaron efecto alguno de la lactación en la supervivencia embrionaria-fetal hasta

el día 15. Sin embargo, Fortun-Lamothe y Prunier (1999) obtuvieron una tasa de implantación menor en hembras lactantes.

El tamaño de camada también fue diferente entre hembras pertenecientes a una u otra línea, ya que tanto el número de nacidos totales como el número de nacidos vivos de la línea R fue menor de nuevo que los de la línea A, siendo el número de nacidos totales de la línea R 4,6 gazapos inferior a la línea A y el número de nacidos vivos, de alrededor de 5 gazapos. Si se relaciona el número de nacidos totales respecto al número de embriones implantados a los 12 días de gestación, obtenemos que la línea A presenta una supervivencia fetal en torno al 75,5% frente a tan sólo el 45,7% de la línea R. Santacreu *et al.* (2005) observaron diferencias significativas en las supervivencias embrionarias y fetales de dos líneas de conejo seleccionadas por alta y baja capacidad uterina. Con el fin de conocer si estas diferencias son debidas al genotipo materno, al embrionario o a la interacción entre ambos, Mocé (2003) y Peiró (2008) han realizado diversos estudios sobre el desarrollo embrionario temprano y sobre el desarrollo de embrionario-fetal a partir de transferencias recíprocas en ambas líneas, demostrando que la hembra es la principal causante de las pérdidas embrionarias y fetales. Otros autores, trabajando en diferentes especies, también apuntan al genotipo materno como el causante de estas diferencias en la supervivencia prenatal (Galvin *et al.*, 1993, en cerdo; Bradford y Nott, 1969, en ratón).

Al analizar los niveles de progesterona en suero sanguíneo de las hembras a los 12 días de gestación, los resultados obtenidos fueron similares para ambas líneas y, además, similares a niveles obtenidos en otros trabajos en este mismo momento de gestación (Nowak y Bahr, 1983; Gadsby, 1989). Siendo ésta una de las hormonas más importantes durante la gestación, sería necesario estudiar posibles variaciones post-implantacionales en los niveles séricos de progesterona o, incluso, si los receptores uterinos o embrionarios para esta hormona sufren algún tipo de modificación en su expresión o en su afinidad. A este respecto, Peiró *et al.* (2008) estudiaron la presencia de polimorfismos en el gen que codifica para el receptor de progesterona, observando que un cambio en un nucleótido podía estar relacionado con una diferencia en el tamaño de camada de 0,5 gazapos.

En resumen, las hembras de la línea R, seleccionada por velocidad de crecimiento, presentan una baja productividad debida, de un lado, a un mayor número de fallos en la inducción de la ovulación. Por otro, muestran mayores tasas tanto de pérdidas embrionarias

tempranas totales y parciales (pre-implantatorias) como tardías totales y parciales (post-implantatorias). Sin embargo su tasa de ovulación y sus niveles séricos de progesterona son idénticos a la línea A, utilizada en este trabajo como control reproductivo.

En el segundo experimento, se ha abordado la evaluación de la expresión de diferentes genes relacionados con el proceso de implantación que podrían explicar parte de las pérdidas pre-implantacionales desde el punto de vista del genotipo embrionario, utilizando estas dos líneas como modelo.

El proceso pre-implantatorio depende, en primer lugar, de que exista un correcto desarrollo de los embriones y, en segundo lugar, es necesario que los mecanismos de reconocimiento materno-embriionario funcionen de forma adecuada, no sólo con el fin de que se produzca la adhesión de los blastocistos sino, además, para impedir que el sistema inmunitario materno reaccione frente al embrión. Por último, también depende del proceso de adhesión, que implica la secreción de factores embrionarios y endometriales para favorecer la implantación y permitir el posterior desarrollo de la placenta (Bowen *et al.*, 1996). En este trabajo, se ha estudiado la expresión relativa de genes relacionados con estos procesos en blastocistos de conejo en el momento anterior a su implantación. Estos genes objeto de estudio han sido el gen POU1F1, en concreto, su transcrito Oct4, el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) y el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (erbB3), además de Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), como genes relacionados con la diferenciación celular y el correcto desarrollo embrionario (Pauken *et al.*, 1999; Hansis *et al.*, 2001), los Interferones γ y $\omega 48$ como genes relacionados con el reconocimiento materno-embriionario (Ijzermans y Marquet, 1989), y la subunidad $\beta 3$ de la Integrina, como gen relacionado con la adhesión y migración molecular (Ferrara *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2001).

La expresión del gen Oct4 en la masa celular interna (ICM) de los blastocistos se ha relacionado en varias ocasiones con la diferenciación celular y se ha tomado como indicador de la calidad embrionaria en numerosas especies (Lonergan *et al.*, 2003; Dode *et al.*, 2006). La expresión de Oct4 no ha sido detectada en células indiferenciadas y, además, ésta aumenta conforme se incrementa el nivel de diferenciación celular (Pesce *et al.*, 1998). Mamo *et al.* (2008) señalaban que la expresión de Oct4 es mayor en ovocitos y cigotos que en los estadios más avanzados de desarrollo, como son los de mórula y blastocisto. Los resultados de este trabajo muestran que la expresión de este gen no difiere estadísticamente en blastocistos de conejo de

5 y 6 días de vida, pese a que parece existir una tendencia no significativa a presentar mayor expresión en estos últimos. En un estudio previo realizado con blastocistos de 5 y 6 días de hembras multíparas en los que se analizó la expresión de este gen en cada embrión de forma individual, pudo observarse un aumento significativo de su expresión (Llobat y Vicente, 2008). De hecho, varios autores señalan que la expresión de Oct4 podría silenciar determinados genes, como diferentes tipos de interferones, cuya expresión está relacionada con el proceso de implantación en estadios más avanzados. A este respecto, Yamamoto *et al.* (1998) ya mostraron un silenciamiento del gen que codifica para el Interferón τ mediado por este transcrito. Relacionado con este hecho, en nuestro estudio hemos encontrado correlaciones negativas entre la expresión de Oct4 y las de otros genes relacionados con la implantación, como el VEGF y el erbB3, pero no con los interferones estudiados, aunque sí hemos observado una menor expresión relativa en blastocistos de 6 días de estos últimos.

Tanto los interferones tipo I (ω 48) como los de tipo II (γ) están relacionados con los procesos de reconocimiento materno-embriionario, con el fenómeno de neovascularización y con la actividad antiluteolítica que ocurre previamente a la implantación, así como con fenómenos de diferenciación del trofoblastema, sobre todo, los de tipo I (Hernández-Ledezma *et al.*, 1993; Lefèvre *et al.*, 2007; Bazer *et al.*, 2009), procesos que tienen lugar entre el tercer y quinto día en el caso del conejo. Así, el blastocisto temprano (72-96 horas), tras una intensa remodelación de las cubiertas y un activo proceso de diferenciación y proliferación del embrioblastema y trofoblastema, se expande. Por otro lado, los interferones tipo II, cuyo único miembro es el Interferón γ , se han relacionado con la implantación en especies prolíficas como los cerdos, mostrando un papel muy importante en el desarrollo temprano embrionario (Cencic *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que estas citoquinas (Interferones γ y ω 48) se expresan en blastocistos de conejo y que lo hacen de modo más activo en blastocistos expandidos en el día 5 post-inseminación que en el día 6. Algunos autores han observado la producción de interferones ya en estadios embrionarios tempranos de conejo e indican que podrían intervenir en el estadio de blastocisto sobre la diferenciación del embrioblastema a epiblasto e hipoblasto, en el fenómeno de decidualización en el endometrio, además de estar asociados con una probable función autocrina favoreciendo la producción de receptores para interferones tanto en el embrión como en el endometrio (Bing *et al.*, 2007). Además, la expresión de esta familia de citoquinas ha sido vinculada con la fertilidad en especies como la bovina u ovina a través del interferon τ , o en la especie porcina mediante el interferon γ (Hernández-Ledezma *et al.*, 1993 en bovino; Early *et al.*, 2001 en ovino; Cencic *et al.*, 2002 en porcino). En

resumen, ambos interferones podrían incrementar su expresión relativa en blastocistos de conejo de 5 días para favorecer, por un lado la expansión y diferenciación del blastocisto y, por otro, bloquear o reducir cualquier respuesta endometrial que comprometa su adhesión y su viabilidad.

El TGF- β es un factor de crecimiento relacionado con el desarrollo de los blastocistos, el desarrollo vascular y las interacciones útero-embrionarias (Kamijo *et al.*, 1998, Mallet *et al.* 2006), además de con la reducción de la respuesta inmunológica (Ouellete *et al.*, 1997). Sus niveles de expresión no se han visto afectados por la edad de los embriones analizados, probablemente debido a que, tanto el desarrollo embrionario como los mecanismos de protección inmunológica en los que está implicado, no han cesado.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que, al igual que los interferones, los genes VEGF y erbB3 están expresándose en blastocistos de conejo, si bien su expresión relativa disminuye en los blastocistos expandidos de 6 días. Los trabajos realizados sobre la expresión VEGF y erbB3 se han realizado generalmente sobre tejidos tumorales o sobre endometrio, existiendo poca información sobre su expresión en embriones. Das *et al.* (1997) observaron la expresión de receptores para VEGF en útero de coneja el día 6 de gestación, además de mostrar que esta expresión era mayor en zonas de implantación que en regiones no implantacionales en el día 8. Artini *et al.* (2008) observaron que la expresión de VEGF en blastocistos humanos cultivados *in vitro* era mayor que en estadios más tempranos de desarrollo embrionario.

Por otro lado, al analizar la expresión de la subunidad $\beta 3$ de la integrina se observó que tan sólo alrededor de un 55% de blastocistos expresaban dicha subunidad a los 5 días frente al 96% de los analizados a 6 días. Estudios previos han demostrado la expresión de diferentes subunidades de integrina tanto en ovocitos como en embriones de distintas especies (Johnson *et al.*, 2001; Arraztoa *et al.*, 2005; Pate *et al.*, 2007). Los resultados observados en nuestro estudio concuerdan con lo observado por Illera *et al.* (2003), donde se demuestra la expresión de la subunidad $\beta 3$ de la Integrina en blastocistos pre-implantacionales y en endometrio de hembras gestantes e implantadas, pero no en hembras no gestantes o reproductivamente inmaduras. Estos resultados sugieren una expresión condicionada a la presencia de blastocistos por parte del endometrio. La expresión relativa de este gen no difiere entre los días 5 y 6 de gestación, aunque sí en la proporción de muestras analizadas, lo que sugiere que se activaría su expresión

en torno al día 5, de modo que su expresión podría desencadenar el fenómeno de adhesión embrionaria.

Respecto a las correlaciones analizadas entre la expresión de los genes estudiados, se han observado correlaciones positivas entre algunas de las expresiones génicas sometidas a estudio (Interferones γ y ω 48, VEGF y erbB3), posiblemente debido a que todos ellos están íntimamente relacionados con el proceso de vascularización y diferenciación celular que ocurre antes de la implantación. Pese a que, tanto el Oct4 como la integrina no han presentado una expresión diferencial entre blastocistos de 5 y 6 días de desarrollo, al analizar las correlaciones entre los diferentes genes estudiados, se ha observado una correlación elevada y negativa entre la expresión del Oct-4 y los relacionados con la diferenciación celular vascular (VEGF y erbB3), lo que parece acorde con la función biológica del gen Oct4 promoviendo la pluripotencialidad celular y no la diferenciación.

Los niveles de expresión relativa de los genes estudiados fueron similares para blastocistos de las dos líneas de selección. Estos resultados sugieren que, para el perfil de expresión génica estudiado, los blastocistos de una y otra línea muestran un desarrollo similar, por lo que los problemas reproductivos detectados en la línea seleccionada por velocidad de crecimiento en cuanto a pérdidas embrionarias parciales y totales dependen de otros factores no estudiados en el presente trabajo.

La inducción de la ovulación y las pérdidas post-implantacionales son los dos factores más importantes en la merma productiva de la línea de crecimiento, y abre diversa vías de actuación. Por un lado práctico, mejorar la inducción de la ovulación favoreciéndola de forma endocrina y, por otro, estudiar las posibles causas mediante el análisis de genes candidatos tanto en receptores como en hormonas y proteínas hipotálamicas e hipofisarias, y tanto ováricos como uterinos, implicados en estos problemas.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES.

-Tanto la inducción de la ovulación como el tamaño de camada (medido tanto por número de nacidos vivos como por el número de nacidos totales) son significativamente mayores en la línea A. La línea R presenta un porcentaje del 45,4% en fallos de inducción de la ovulación, en torno a un 20% de pérdidas embrionarias o pre-implantatorias (hasta el día 12 de gestación) y cerca del 50% de pérdidas fetales o post-implantatorias (a partir del día 12 de gestación). Sin embargo, no difieren en los niveles de progesterona a 12 días de gestación.

- El análisis de la expresión de los genes estudiados en blastocistos obtenidos de hembras núlparas no mostró ninguna diferencia entre las líneas. Sin embargo, sí se observaron diferencias entre blastocistos recuperados a los 5 y a los 6 días de gestación, presentando los primeros mayores niveles en la expresión de los genes que codifican para el receptor 3 del Factor de Crecimiento Epidérmico (erbB3), para el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), y para los Interferones γ y ω 48. Por otro lado, el porcentaje de blastocistos que expresan el gen que codifica para la Integrina α V β 3 es estadísticamente superior en los recuperados a los 6 días de gestación.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA.

- 1 Aboagye-Mathiesen G, Tóth FD, Zdravkovic M, Ebbesen P. 1995. Human trophoblast Interferons: production and possible roles in early pregnancy. *Early Pregnancy* 1:41-53.
- 2 Adams CE. 1960. Prenatal mortality in the rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *J Reprod Fertil* 1:36-44.
- 3 Arraztoa JA, Zhou J, Marcu D, Cheng C, Bonner R, Chen M, Xiang C, Brownstein M, Maisey K, Imarai M, Bondy C. 2005. Identification of genes expressed in primate primordial oocytes. *Human Reprod* 20:476-483.
- 4 Artini PG, Valentino V, Monteleone P, Simi G, Parisen-Toldi MR, Cristello F, Cela V, Genazzani AR. 2008. Vascular Endothelial Growth Factor level changes during human embryo development in culture medium. *Gyn Endocr* 24:184-187.
- 5 Bazer FW, Spencer TE, Ott TL. 1997. Interferón Tau: a novel pregnancy recognition signal. *Am J Reprod Immunol* 37(6): 412-420.
- 6 Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA. 2009. Interferons and uterine receptivity. *Semin Reprod Med* 27(1):90-102.
- 7 Beato M, 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56(3): 335.
- 8 Bolet G, Theau-Clément M. 1994. Fertilization rate and preimplantation embryonic development in two rabbit strains of different fecundity, in purebreeding and crossbreeding. *Anim Repr Sci* 36:153-162.
- 9 Bowen JA, Bazer FW, Burghardt RC. 1996. Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoctoderm *in vivo*. *Biol Reprod* 55:1098-1106.
- 10 Bowen JA, Hunt JS. 2000. The role of Integrins in Reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med* 223(4):331-343.
- 11 Bowen JA, Burghardt RC. 2004. Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals. *Cell Dev Biol* 11:93-104.
- 12 Boyer LA, Mathur D, Jaenisch R. 2006. Molecular control of pluripotency. *Curr Op Gen Dev* 16:455-462.
- 13 Bradford GE, Nott CFG. 1969. Genetic control of ovulation rate and embryo survival in mice. II. Effects of crossing selected lines. *Genetics* 63:907-918.
- 14 Brown N, Deb K, Paria BC, Das SK, Reese J. 2004. Embryo-Uterine Interactions via the Neuregulin Family of Growth Factors During Implantation in the Mouse. *Biol Reprod* 71:2003-2011.

- 15 Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. 2000. Embryo Implantation. *Dev Biol* 223:217-237.
- 16 Carver J, Martin K, Spyropoulou I, Barlow D, Sargent I, Mardon H. 2003. An in-vitro model for stromal invasion during implantation of the human blastocyst. *Human Reprod* 18(2):283-290.
- 17 Cencic A, Henry C, Lefèvre F, Huet JC, Koren S, La Bonnardière C. 2002. The porcine trophoblastic Interferón- γ , secreted by a polarized epithelium, has specific structural and biochemical properties. *Eur J Biochem* 269:2772-2781.
- 18 Charpigny G, Reinaud P, Huet JC, Guillomot M, Charlier M, Pernollet JC, Martal J. 1988. High homology between a trophoblastic protein (trophoblastin) isolated from ovine embryo and α -Interferóns. *Febs Letters* 228(1):12-16.
- 19 Charlier M, L'Haridon R, Boisnard M, Martal J, Gaye P. 1993. Cloning and Structural analysis of four genes encoding Interferon- ω in rabbit. *J Int Res* 13:313-322.
- 20 Cross JC, Roberts RM. 1989. Porcine Conceptuses Secrete an Interferón During the Preattachment Period of Early Pregnancy. *Biol Reprod* 40:1109-1118.
- 21 Das SK, Chakraborty I, Wang J, Dey SK, Hoffman LH. 1997. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and VEGF-Receptor Messenger Ribonucleic Acids in the Peri-Implantation Rabbit Uterus. *Biol Reprod* 56:1390-1399.
- 22 De Maeyer E, De Maeyer-Guignard J. 1988. Interferón Gamma. *Curr Opin Immunol* 4(3):321-326.
- 23 Ealy AD, Larson SF, Liu L, Alexenko AP, Winkelman GL, Kubisch HM, Bixby JA, Roberts RM. 2001. Polymorphic forms of expressed bovine interferon-tau genes: relative transcript abundance during early placental development, promoter sequences of genes and biological activity of protein products. *Endocrinology* 142:2906-2915.
- 24 Erhardt S, Su I, Schneider R, Barton S, Bannister AJ, Pérez-Burgos L, Jenuwein T, Kouzarides T, Tarakhovsky A, Surani MA. 2003. Consequences of the depletion of zygotic and embryonic enhancer of zeste 2 during preimplantation mouse development. *Development* 130:4235-4248.
- 25 Ernst CA, Rhees BK, Miao CH, Atchley WR. 2000. Effect of long-term selection for early postnatal growth rate on survival and prenatal development of transferred mouse embryos. *J Repr Fertil* 118:205-210.
- 26 Estany J, Camacho J, Baselga M, Blasco A. 1992. Selection response of growth rate in rabbits for meat production. *Genet Sel Evol* 24: 527-537.
- 27 Evans RD, Itoh Y. 2007. Analyses of MT1-MMP activity in cells. *Methods Mol Med*.

135:239-249.

- 28 Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. 1998. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 4:336-340.
- 29 Fortun-Lamothe L, Prunier A, Lebas F. 1993. Effects of lactation on fetal survival and development in rabbit does mated shortly after parturition. *J Anim Sci* 71:1882-1886.
- 30 Fortun-Lamothe L, Prunier A. 1999. Effects of lactation, energetic deficit and remating interval on reproductive performance of primiparous rabbit does. *Anim Reprod Sci* 55:289-298.
- 31 Fung MC, Sia SF, Leung KN, Mak NK. 2004. Detection of differential expression of mouse Interferon-alpha subtypes by polymerase chain reaction using specific primers. *J Immunol Methods* 284:177-186.
- 32 Gadsby JE. 1989. Control of corpus luteum function in the pregnant rabbit. *J Reprod Fertil Suppl* 37:45-54.
- 33 Galvin JM, Wilmut I, Day BN, Ritchie M, Thompsom M, Haley CS. 1993. Reproductive performance in relation to uterine and embryonic traits during early gestation in Meishan, Large White and crossbred sows. *J Reprod Fert* 98(2):377-384.
- 34 Godornes C, Leader BT, Molini BJ, Centurion-Lara A, Lukehart SA. 2007. Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *Cytokine* 38:1-7.
- 35 Goldman S, Shalev E. 2006. Difference in Progesterone Receptor Isoforms Ratio, between Early and Late First Trimester Human Trophoblast, is associated with Differential Cell Invasion and Matrix Metalloproteinase2 (MMP2) Expression. *Biol Reprod* 74(1):13-22.
- 36 Guillomot M. 1999. Changes in Extracellular Matrix Components and Cytokeratins in the Endometrium during Goat Implantation. *Placenta* 20:339-345.
- 37 Hamada Y, Schlaff S, Kobayashi Y, Santulli R, Wright KH, Wallach LL. 1980. Inhibitory effect of prolactin on ovulation in the *in vitro* perfused rabbit ovary. *Nature* 285:161-163.
- 38 Hansis C, Tang Y, Grifo JA, Krey LC. 2001. Analysis of Oct-4 expression and ploidy in individual human blastomeres. *Mol Human Reprod* 7:155-161.
- 39 Hernández-Ledezma JJ, Sikes JD, Murphy CN, Watson AJ, Schultz GA, Roberts M. 1993. Expression of Bovine Trophoblast Interferon in Conceptuses Derived by *In Vitro* Techniques. *Biol Reprod* 47:374-380.
- 40 Hoffman LH, Olson GE, Carson DD, Chilton BS. 1998. P4 and implanting blastocysts regulate Muc1 expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinology* 139:266-271.

- 41 Hohn HP, Mootz U, Denker HW. 1992. Development of rabbit preimplantation blastocysts cultured with precultured endometrial tissue. *J Reprod Fert* 95:409-420.
- 42 Hynes RO. 2002. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med* 8:918-921.
- 43 Illera MJ, Lorenzo PL, Gui Y, Beyler SA, Apparao KBC, Lessey BA. 2003. A role for $\alpha\beta 3$ integrin during implantation in the rabbit model. *Biol Reprod* 68:766-771.
- 44 Ijzermans JN, Marquet RL. 1989. Interferón-gamma: a review. *Immunobiology* 179(4-5):456-73.
- 45 Imakawa K, Anthony RV, Kazemi M, Marotti KR, Polites HG, Roberts RM. 1987. Interferón-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. *Nature* 330(26):377-379.
- 46 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez WR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49.
- 47 Johnson DC, Chatterjee S. 1993. Embryo implantation in the rat uterus induced by epidermal growth factor. *J Repr Fert* 99:557-559.
- 48 Johnson GA, Bazer FW, Jaeger LA, Garlow Je, Pfarrer C, Spencer TE, Burghardt RC. 2001. Muc-1, integrin and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. *Biol Reprod* 65:820-828.
- 49 Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. 2006. TGF- β superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction* 132:217-232.
- 50 Kamijo T, Rajabi MR, Mizunuma H, Ibuki Y. 1998. Biochemical evidence for autocrine/paracrine regulation of apoptosis in cultured uterine epithelial cells during mouse embryos implantation *in vitro*. *Mol Hum Reprod* 4:990-998.
- 51 Kawasaki H, Moriyama M, Nariuchi H. 1992. Mechanism of Augmentation of Endotoxin Fever by Beta Interferon in Rabbits: Possible Participation of Tumor Necrosis Factor (Cachectin). *Infection and Immunity* 60(3):933-936.
- 52 Kermabon AY, Belair L, Theau-Clément M, Salesse R, Djiane J. 1994. Effects of anoestrus and bromocryptine treatment on the expression of prolactin and LH receptors in the rabbit ovary during lactation. *J Reprod Fert* 102:131-138.
- 53 Kimmins S, McLaren LA. 1999. Cyclin Modulation of Integrin in Bovine Endometrium. *Biol Reprod* 61:1267-1274.
- 54 Lefèvre F, Boulay V. 1990. A novel and Atypical type one Interferón Gene Expressed by

- Trophoblast during Early Pregnancy. *J Biol Chem* 268(26):19760-19768.
- 55 Lefèvre P, Campos DB, Murphy BD. 2007. Talk to me: the embryo dictates gene expression by the endometrium. *Endocrinology* 148(9):4170-4172.
- 56 Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA. 1992. Integrin adhesion molecular in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest* 90:188-195.
- 57 Li HT, Ma B, Mi JW, Jin HY, Xu LN, Wang JW. 2007. Molecular Cloning and Functional Analysis of Goose Interferon Gamma. *Vet Immunol Immunopathol* 117(1-2):67-74.
- 58 Li X, Kato Y, Tsunoda Y. 2005. Comparative analysis of development-related gene expression in mouse preimplantation embryos with different developmental potencial. *Mol Reprod Dev* 72:152-160.
- 59 Lin KC, Kawamura N, Okamura H, Mori T. 1988. Inhibition of ovulation, steroidogenesis and collagenolytic activity in rabbits by sulpiride-induced hyperprolactinaemia. *J Reprod Fert* 83:611-618.
- 60 Linnemeyer PA, Pollack SB. 1993. Murine granulated metrial gland cells at uterine implantation sites are natural killer lineage cells. *J Immunol* 147(8):2530-2535.
- 61 Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. *Methods* 25:402-408.
- 62 Llobat L, Vicente JS. 2008. Oct-4 expression in blastocyst from two selected lines. 9th World Rabbit Congress 163-168.
- 63 Lonergan P, Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Moreira PM, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP. 2003. Temporal Divergence in the Pattern of Messenger RNA Expression in Bovine Embryos Cultured from the Zygote to Blastocyst Stage *In Vitro* or *In Vivo*. *Biol Reprod* 69:1424-1431.
- 64 Lopata A, Bentin-Ley U, Enders A. 2002. "Pinopodes" and Implantation. *Rev Endocrin Met Dis* 3:77-86.
- 65 Mallet C, Vittet D, Feige JJ, Bailly S. 2006. TGF- β induces vasculogenesis and inhibits angiogenic sprouting in an embryonic stem cell differentiation model: respective contribution of ALK1 and ALK5. *Stem Cells* 24:2420-2427.
- 66 Mamo S, Gal AB, Polgar Z, Dinnyes A. 2008. Expression profiles of the pluripotency marker gene POU5F1 and validation of reference genes in rabbit oocytes and preimplantation stage embryos. *BMC Mol Biol* 9:67-80.
- 67 Mehaisen GKM, Vicente JS, Lavara R. 2004. *In vivo* embryo recovery rate by laparoscopic technique from rabbit does selected for growth rate. *Reprod Dom Anim*

- 39:347-351.
- 68 Mehaisen GKM, Viudes-de-Castro P, Vicente JS, Lavara R. 2005. *In vitro* and *in vivo* viability of vitrified and non-vitrified embryos derived from eCG and FSH treatment in rabbit does. *Theriogenology* 65:1279-1291.
 - 69 Mocé ML. 2003. Tesis Doctoral: Maternal and embryonic genetic effects on prenatal survival in an experiment of divergent selection for uterine capacity in rabbit. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Ciencia Animal.
 - 70 Mocé ML, Santacreu MA, Climent A, Blasco A. 2004. The effect of divergent selection for uterine capacity on prenatal survival in rabbits: Maternal and embryonic genetic effects. *J Anim Sci* 82:68-73.
 - 71 Monniaux D, Huet-Calderwood C, Le Bellego F, Fabre S, Monget P, Calderwood DA. 2006. Integrins in the Ovary. *Sem Reprod Med* 24(4): 251-261.
 - 72 Muscettola M, Massai L, Lodi L, Briganti F, Fontani G, Lupo C. 2003. IFN- γ production in rabbits: Behavioral and endocrine correlates. *Life Sci* 72:1331-1343.
 - 73 Navarrete Santos A, Ramin N, Tonack S, Fischer B. 2008. Cell lineage-specific signaling of insulin and insulin-like growth factor I in rabbit blastocysts. *Endocrinology* 149(2):515-524.
 - 74 Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A. 1998. Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell* 95:379-391.
 - 75 Nowak RA, Bahr JM. 1983. Effect of embryo removal on concentrations of progesterone and LH in the rabbit. *J Reprod Fert* 68:395-399.
 - 76 Ouellette MJ, Dubois CM, Bergeron D, Roy R, Lambert RD. 1997. TGF beta 2 in rabbit blastocoelic fluid regulates CD4 membrane expression : possible role in the success of gestation. *Am J Reprod Immunol* 37(1):125-136.
 - 77 Paria BC, Dey SK. 1990. Preimplantation embryo development *in vitro*: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci* 87:4756-4760.
 - 78 Pate BJ, White KL, Winger QA, Rickords LF, Aston KI, Sessions BR, Li GP, Campbell KD, Weimer B, Bunch TD. 2007. Specific Integrin Subunits in Bovine Oocytes, Including Novel Sequences for Alpha 6 and Beta 3 Subunits. *Mol Reprod Dev* 74:600-607.
 - 79 Pauken CM, Capco DG. 1999. Regulation of Cell Adhesion During Embryonic Compactacion of Mammalian Embryos: Roles for PKC and β -Catenin. *Mol Reprod Dev* 54:135-144.

- 80 Peiró R. 2008. Tesis Doctoral: Tesis Doctoral: Candidate Gene for Litter Size and its components: Progesterone Receptor Gene. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Ciencia Animal.
- 81 Peiró R, Merchán M, Santacreu MA, Argente MJ, García ML, Folch JM, Blasco A. 2008. Identification of single-nucleotide polymorphism in the progesterone receptor gene and its association with reproductive traits in rabbits. *Genetics* 180:1699-1705.
- 82 Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- 83 Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Schöler H. 1998. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Devel* 71:89-98.
- 84 Pringent SA, Lemoine NR, Hughes CM, Plowman GD, Selden C, Gullick WJ. 1992. Expression of the c-erbB-3 protein in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 7(7):1273-1278.
- 85 Qi B, Zheng W, Li W, Wei Q, Chen Q. 2007. Cloning and analysis of IFGR (interferon responsive gene) in rabbit oocytes and preimplantation embryos. *Biocell (Mendoza)* 31(2): 199-203.
- 86 Quintela L, Peña A, Barrio M, Vega MD, Díaz R, Maseda F, García P. 2001. Reproductive performance of multiparous rabbit lactating does: effect of lighting programs and PMSG use. *Reprod Nutr Dev* 41(3):247-257.
- 87 Roberts RM, Ezashi T, Das P. 2004. Trophoblast gene expression: Transcription factors in the specification of early trophoblast. *Repr Biol and Endocrin* 2(47):1-9.
- 88 Rosner MH, De Santo RJ, Arnheiter H, Staudt LM. 1991. Oct-3 is a maternal factor required for the first mouse embryonic division. *Cell* 64(6):1103-1110.
- 89 Santacreu MA, Mocé ML, Climent A, Blasco A. 2005. Divergent selection for uterine capacity in rabbits. Correlated response in litter size and its components estimated with a cryopreserved control population. *J Anim Sci* 83:2303-2307.
- 90 Sharkey A. 1998. Cytokines and implantation. *Rev Reprod* 3:52-61.
- 91 Shimonovitz S, Hurwitz A, Hochner-Celnikier D, Dushnik M, Anteby E, Yagel S. 1998. Expression of gelatinase B by trophoblast cells: down-regulation by progesterone. *Am J Obstetr Gynec* 178: 457-461.
- 92 Schmidt T, Fischer S, Tsikolia N, Navarrete Santos A, Rohrbach S, Ramin N, Thieme R, Fischer B. 2008. Expression of adipokines in preimplantation rabbit and mice embryos. *Histochem Cell Biol* 129:817-825.
- 93 Schöler HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P. 1990. New type of POU

- domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344:435-439.
- 94 Shen L, Tso P, Woods SC, Sakai RR, Davidson S, Liu M. 2007. Hypothalamic Apolipoprotein A-IV is regulated by leptin. *Endocrinology* 148(6):2681-2689.
- 95 Smith C, Berg D, Beaumont S, Standley NT, Wells DN, Pfeffer PL. 2007. Simultaneous gene quantitation of multiple genes in individual bovine nuclear transfer blastocysts. *Reproduction* 133(1):231-42.
- 96 Spelsberg TC, Rories C, Rejman JJ, Goldberger A, Fink K, Lau CK, Colvard DS, Wiseman G. 1989. Steroid Action on Gene Expression: Possible Roles of Regulatory Genes and Nuclear Acceptor Sites. *Biol Reprod* 40:54-69.
- 97 Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. 2004. Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction* 128(6):657-68.
- 98 Tamada H, Higashiyama C, Takano H, Kawate N, Inaba T, Sawada T. 1999. The effects of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor on Preimplantation-Embryo Development and Implantation in the Rat. *Life Sci* 64:1967-1973.
- 99 Tao T, Niemann H. 2000. Cellular characterization of blastocysts derived from rabbit 4-, 8- and isolated blastomeres cultured *in vitro*. *Human Reprod* 15(4):881-889.
- 100 Torres S, Hulot F, Sevellec C. 1987. Early stages of embryonic development in two rabbit genotypes. *Reprod Nutr Dev* 27(3):715-719.
- 101 Valdes G, Erices R, Chacón C, Corthorn. 2008. Angiogenic, hypermeability and vasodilator network in utero-placental units along pregnancy in the guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Reprod Biol Endocrin* 6:13-24
- 102 Van der Flier A, Sonnenberg A. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305:285-298.
- 103 Vicente JS, Viudes de Castro MP, García Mde L, Baselga M. 2003. Effect of rabbit line on a program of cryopreserved embryos by vitrification. *Reprod Nutr Dev* 43(2):137-143.
- 104 Wathes DC. 1992. Embryonic mortality and the uterine environment. *J Endocrin* 134:321-325.
- 105 Wilson ME, Ford SP. 1997. Differences in trophectoderm mitotic rate and P450 alpha-hydroxylase expression between late preimplantation Meishan and Yorkshire conceptuses. *Biol Reprod* 56(2):380-385.
- 106 Wilson ME, Biensen NJ, Youngs CR, Ford SP. 1998. Development of Meishan and Yorkshire littermate conceptuses in either a Meishan or Yorkshire uterine environment to day 90 of gestation and to term. *Biol Reprod* 58:905-910.
- 107 Yamamoto H, Flannery ML, Kupriyanov S, Pearce J, McKercher SR, Henkel GW, Maki

RA, Werb Z, Oshima RG. 1998. Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2. *Genes Dev* 12:7883-7891.

108 Yoshimura Y, Jinno M, Oda T, Shiokawa S, Yoshinaga A, Hanyu I, Akiba M, Nakamura Y. 1992. Prolactin inhibits ovulation by reducing ovarian plasmin generation. *Biol Reprod* 50:1223-1230.