

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA



DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL

Estudio de los factores materno-embriónicos que determinan la fertilidad y prolificidad en una línea de conejo seleccionada por velocidad de crecimiento

TESIS DOCTORAL

Lola Llobat Bordes

Valencia, Enero 2012

Directores

Dr. Francisco Marco Jiménez (Profesor Titular de Universidad, UPV)

Dr. José Salvador Vicente Antón (Catedrático de Universidad, UPV)

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL

Esta tesis ha sido escrita y presentada como uno de los requisitos para optar al grado de Doctor por el Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia.

Valencia, Enero de 2012

El Doctorando

Fdo. Lola Llobat Bordes

Los directores de tesis

Fdo. Francisco Marco

Jiménez

Fdo. José Salvador Vicente

Antón

A mis padres

A Alba, la luz de mi vida

*Aus diesem wie möglich ist notwendig, um noch einmal zu versuchen und
nich wieder entstehen können*

*(Para que pueda surgir lo posible es preciso intentar una y otra vez lo
imposible)*

H. Hesse

*Celui qui est vraiment libre que veulent ce qu'il est capable et pas
seulement ce qui plaît*

*(El que es verdaderamente libre desea solamente lo que es capaz de
realizar y hace solamente lo que le agrada)*

JJ. Rosseau

Agradecimientos

Es tanto lo que tengo que agradecer y a tantas personas, que no sé muy bien por dónde empezar, así que un millón de gracias a todos los que me han ayudado con mucho o poco tiempo, estén o no aquí.

Por supuesto, mil gracias a mis directores, Paco y José. A José, por enseñarme tanto en todos los aspectos y a Paco, por el apoyo y los empujones. A la Rachel, por ser mi compi de tantas y tantas cosas, y por intentar hacerme más fácil eso de la genética cuantitativa. Ánimo, que ya falta poco para la tuya, aunque como siempre te digo, lo tienes chupado. A Pilar y toda su tropa, por darle color al laboratorio, y, cómo no, a las “Supernenas”, Mara, Carmen y Estrellita, por alegrar los últimos momentos (lo sé, lo sé, tenemos una pendiente). También me gustaría agradecer a todo el personal del departamento de Ciencia Animal el tiempo dedicado pero, en especial, a Noelia por el apoyo de todo tipo en muchos momentos y a Luis García, por el tiempo dedicado. Ah! Y, por supuesto, a Fede por sus paellas. Al Dr. Manuel Baselga, por financiar todo esto y al Dr. Agustín Blasco, por hacer que la estadística sea algo más sencillo. A mis compis de máster, pero en especial, a les “valencianetes del nord”, la Marins y la Lliber, aunque sabes que eres mucho más que una compi de máster. Espero que todo te vaya bien en la ‘América profunda’, nos vemos a la vuelta. No puedo olvidarme de mis “Haleños”, Gemma, Ceci, Antonio y Laura, que me hicieron sentirme como en casa durante mi estancia en tierras teutonas. Estos agradecimientos no estarían completos si no les diera las gracias a Ángel y a Antonio, por darme mi primera oportunidad, por meterme en el cuerpo el gusanillo de la investigación y por otras muchas cosas. De corazón, mil gracias.

Muchas son las personas que a lo largo de estos años me han apoyado de muy diferentes formas, así que intentaré no olvidarme de nadie. A Amparo y Milio, a Raúl y a Rafa, por todos estos años, no sé cómo agradecerlos todo el apoyo en los buenos y en

los malos momentos. Sabéis que me tendréis siempre a vuestro lado. En primer lugar, a los recién estrenados papis: Amparito, gracias por estar ahí siempre, no sé cómo podría agradecerte tantos años de apoyo y alegrías, por ayudarme a tener los pies en el suelo pero sobre todo, por ser una de las personas más honestas que conozco. Me alegro de que estés en mi vida y espero que siempre sea así. A Milio, por tantos buenos ratos, no te preocupes, pase lo que pase, seguiré riéndome de tus coñas, aunque sea la única. Nora, cuando seas mayor, estarás muy orgullosa de tus papis, estoy segura. A Raúl, porque sé que siempre estarás ahí pase lo que pase como todos estos años. Sabes que es recíproco. Y, por supuesto, a mi Rafita, por todo lo que hemos compartido a lo largo de muchos años, por tantos buenos ratos, por hacerme reír siempre con las cosas más absurdas, por enseñarme a respetar cualquier idea y por darme una visión de la vida tan particular y tan tuya, mil gracias. Sabes que siempre me tendrás a tu lado (siempre y cuando haya café de por medio, claro). Espero que no vuelvan a abducirnos nunca más.

A mi hermana por los buenos momentos y por darme lo que más quiero, gracias a ti también, cuñi. A Alba, por enseñarme sin darse cuenta, qué es lo realmente importante.

Y, por último, un millón de gracias y más, a mis padres. Una vida no sería suficiente para agradeceros todo lo que habéis hecho por mí. Gracias por el amor, el apoyo, los consejos y tantas otras cosas. Creo que, después de todo, no he salido tan mal. Pero, sobre todo, gracias por enseñarme día a día a ser mejor persona y recordarme que eso es lo realmente importante. Gracias por enseñarme el valor de las cosas. Mamá, espero que estés orgullosa porque nada de lo que he hecho o de lo que haga a lo largo de mi vida sería igual sin ti.

RESUMEN

En esta tesis, se ha caracterizado reproductivamente una línea de conejo seleccionada por velocidad de crecimiento (línea R), evaluando las pérdidas a lo largo de la gestación y sus posibles causas. El documento se ha estructurado en dos bloques: (i) formado por dos experimentos, en los que se han determinado las pérdidas en las diferentes etapas gestacionales, así como los niveles hormonales de progesterona, 17β -estradiol e IGF-I en distintos momentos de la gestación, y la influencia que los genotipos embrionario y materno tienen sobre las pérdidas, y (ii) formado por tres experimentos, donde se estudió la expresión relativa de diferentes genes relacionados con los fenómenos de desarrollo embrionario y de implantación.

Los resultados obtenidos en el primer experimento fueron que la línea R presenta una baja respuesta a la inducción de la ovulación, además de elevadas pérdidas implantacionales (31%), fetales (40%) y perinatales (15%), pese a presentar tasas de ovulación, de fecundidad y de desarrollo embrionario hasta las 48 horas similares a las observadas en otras líneas de conejo. Una posible explicación de estas pérdidas gestacionales es, tal vez, como consecuencia de unos bajos niveles de 17β -estradiol a 12 y a 24 días de gestación que implican una menor producción de progesterona a 24 días. Por su parte, los elevados niveles de IGF-I observados a 12 días de gestación, podrían poner de manifiesto alteraciones metabólicas en esta línea, pudiendo influir en las elevadas pérdidas gestacionales.

En el segundo experimento, se estudió el efecto de los genotipos embrionario y materno en las pérdidas. Los resultados mostraron que, tanto la supervivencia embrionaria (hasta los 14 días de gestación) como el peso de la placenta fetal dependen de ambos genotipos, mientras que la supervivencia fetal (a los 25 días de gestación) y el peso fetal son afectados por el genotipo embrionario. La supervivencia fetal a 25 días de gestación fue mayor para embriones de la línea A independientemente del genotipo de la receptora. Por su parte, tanto el peso fetal como el peso de la placenta fetal fueron mayores para la línea R. En este mismo experimento, se controló el peso de las hembras (R y A) a lo largo de la gestación. Cuando se analizó el incremento de peso entre el día 14 y el día 25 de gestación, las

hembras de la línea A presentaron mayores incrementos. No obstante, el peso al final de la gestación fue similar para ambas líneas.

Dentro del segundo bloque, en el tercer experimento de esta tesis se evaluó la expresión génica relativa de los genes Oct4, VEGF, erbB3 y TGF- β 2 en embriones en diferentes etapas de desarrollo previas a la implantación para determinar el momento idóneo de la valoración preimplantacional. Se observaron diferencias en la expresión de Oct4, VEGF y TGF- β 2, aumentando la expresión de estos dos últimos en el sexto día de gestación, mientras que la expresión de Oct4 decrece a partir del cuarto día. Dado que el Oct4 es un transcrito relacionado con la pluripotencialidad, y VEGF y TGF- β 2 están relacionados con fenómenos necesarios para la implantación como la neovascularización o proliferación celular, los resultados de este experimento indican que, a partir del quinto día de gestación, los embriones de conejo disminuyen la expresión de Oct4 como mecanismo intrínseco para permitir que tenga lugar la implantación. Esta reducción en la expresión de Oct4 observada en los días 5 y 6 de desarrollo preimplantacional, en contraste con la sobre-expresión de VEGF y TGF- β 2, podría estar relacionada con una expresión de genes relacionados con efectos angiogénicos en el endometrio materno. Por otra parte, en este experimento se detectó la expresión del receptor erbB3 tanto a cuatro, como a cinco y seis días de desarrollo, aunque no se observaron diferencias en esta expresión en los diferentes momentos de desarrollo embrionario, posiblemente debido a que su función está enfocada a la diferenciación y maduración del blastocisto.

Dado que la elección de un gen de referencia es fundamental para obtener resultados fiables de expresión génica relativa y dado que las dos líneas de conejo presentaron un fenotipo diferente, en el cuarto experimento se estudió la posible influencia del genotipo de la línea sobre la estabilidad del gen de referencia utilizado. Se analizó la estabilidad de los genes de referencia más empleados en embriones, como son H2afz y GAPDH, así como la media geométrica de ambos, mediante tres algoritmos distintos. Posteriormente, para normalizar los datos de expresión génica relativa obtenidos en embriones de ambas líneas fue analizado el genotipo para los genes Oct4, VEGF, TGF-

$\beta 2$, erbB3 e lfn- γ . Los resultados obtenidos mostraron que la normalización con GAPDH o con la media geométrica de GAPDH y H2afz son los más adecuados cuando se estudia la expresión génica relativa en embriones de conejo independientemente del genotipo.

En el último experimento de esta tesis, se analizó la expresión génica relativa de los genes Oct4, erB3, TGF- $\beta 2$, VEGF e interferón γ , en endometrio y embriones de ambas líneas a los 6 días de gestación, así como la expresión relativa de genes relacionados con la gestación y el sistema de señalización IGF, como son IGF-I, IGF-II y sus receptores, en el mismo momento de gestación. Los resultados obtenidos únicamente mostraron diferencias significativas en la expresión génica del receptor de IGF-II que presentó, tanto en endometrio como en embriones, una expresión menor en la línea R.

En conclusión, la línea R, seleccionada por velocidad de crecimiento, muestra unas elevadas pérdidas a lo largo de toda la gestación que podrían estar relacionadas con unos bajos niveles séricos de 17β -estradiol y progesterona, además de con unos elevados niveles de IGF-I. Por otra parte, los resultados obtenidos en relación a la expresión génica a seis días de factores relacionados con el proceso implantacional no parecen dar información acerca de las posibles causas de estas pérdidas, a excepción de una baja expresión del receptor IGF-IIIR, tanto en embriones como en tejido endometrial que, junto con los elevados niveles séricos de IGF-I, podría ser un indicador de alteraciones metabólicas en la línea R.



Abstract

In this thesis, a rabbit line selected for growth rate (line R) is reproductively characterised, assessing the losses throughout gestation and potential causes. The document is structured in two sections: (i) consisting of two experiments, where losses in different stage of gestation and progesterone, 17β -oestradiol and IGF-I serum levels at different times of gestation are determined, as well as the influence of embryonic and maternal genotype in these losses, and (ii) consisting of three experiments, where relative expression of candidate genes related with embryonic development and implantation are studied.

Line R presented a low response to ovulation induction, as well as high implantational (31%), foetal (40%) and perinatal (15%) losses. In contrast, ovulation, fertility and embryonic development rates up 48 hours were similar to those observed in other rabbit lines. Gestational losses may be due to low 17β -oestradiol levels at 12 and 24 days of gestation, which involved a decrease of progesterone levels at 24 days. Meanwhile, high IGF-I levels at 12 days of gestation may indicate metabolic alterations in this line with influence on gestational losses.

In the second experiment, embryonic and maternal genotype effects in losses were studied. Results showed that embryonic survival (up to 14 days of gestation) and foetal placental weight depend on two genotypes, whereas foetal survival (at 25 days of gestation) and foetal weight are affected on embryonic genotype. Foetal survival at 25 days of gestation was higher for embryos from line A in independently of recipient genotype. On the other hand, foetal weight and foetal placental weight were higher for line R. In this experiment, female weight throughout gestation was monitored. Females of line A presented higher increase of weight between days 14 and 25 of gestation than females from line R. However, weight at 25 days of gestation was similar in both lines.

In the second section, relative gene expression of Oct4, VEGF, erbB3 and TGF- β 2 genes in rabbit embryos at different stages of development prior to implantation was analysed to assess the right time for preimplantational valuation. So, there were differences in Oct4, VEGF and TGF- β 2 expression, with the expression of VEGF and TGF- β 2 increasing at sixth day of gestation, whereas Oct4 expression decreased at day four. Since Oct4 is a transcript associated with pluripotency and VEGF and TGF- β 2 are related with necessary phenomena for implantation such as neovascularisation or cellular proliferation, results of this experiment suggest that from the fifth day of gestation, Oct4 expression decreases in rabbit embryos as an intrinsic mechanism to allow implantation. Reduction of Oct4 transcript expression observed at 5 and 6 days, in contrast to over-expression of VEGF and TGF- β 2, could be related with expression of genes related to angiogenic effects in maternal endometrium. Moreover, in this experiment expression of erbB3 receptor was detected at four, five and six days of development, although there were no differences in expression at different stages of embryonic development, probably because its function is focused on differentiation and maturation of the blastocyst.

Since the choice of a suitable reference gene is essential to obtain reliable results on gene relative expression and these rabbit lines presented different phenotypes, in the fourth experiment, influence of line genotype in stability of reference gene was studied. Stability of two commonly reference genes used in rabbit embryos, namely GAPDH and H2afz, and the geometric average of both, were analysed using three different algorithms. Then, in order to normalise relative gene expression data obtained in embryos from both lines, the genotype was analysed to the Oct4, VEGF, TGF- β 2, erbB3 and Inf- γ . Results showed that normalisation with GAPDH or with geometric average of GAPDH and H2afz is more appropriate when studying relative gene expression in rabbit embryos regardless of the genotype.

Thus, in the last experiment of this thesis, relative expression of Oct4, erbB3, TGF- β 2, VEGF and Ifn- γ genes was analysed in endometrium and embryos of two lines at day six of gestation, and relative expression of genes related to pregnancy and the IGF

signalling system, such as IGF-I, IGF-II and their receptors at the same time of gestation were also analysed. Results only showed significant differences in gene expression of IGF-II receptor, which presented lower expression in endometrium and embryos of line R.

In conclusion, line R, selected by growth rate, showed elevated losses throughout gestation that could be related to low serum levels of 17β -oestradiol and progesterone, and higher levels of IGF-I. Moreover, genic expression of factors related with the implantation process does not seem to provide information on causes of losses, except for lower expression of IGF-IIR receptor in embryos and endometrial tissue at day six. Higher serum levels of IGF-I and lower expression of IGF-IIR may indicate metabolic alterations in line R.



Resum

En aquesta tesi, s'ha caracteritzat reproductivament una línia de conill seleccionada per velocitat de creixement (línia R), avaluant les pèrdues al llarg de la gestació i les possibles causes. El document ha sigut estructurat en dos blocs: (i) format per dos experiments, en els quals s'han determinat les pèrdues en les diferents etapes gestacionals, així com els nivells hormonals de progesterona, 17β -estradiol i IGF-I en diferents moments de la gestació, i la influència que els genotips embrionari i matern tenen sobre les pèrdues, i (ii) format per tres experiments, on es va estudiar l'expressió relativa de diferents gens relacionats amb els fenòmens de desenvolupament embrionari i de implantació.

Els resultats obtinguts en el primer experiment varen ser que la línia R presenta una baixa resposta a la inducció de l'ovulació, així com elevades pèrdues implantacionals (31%), fetals (40%) i perinatals (15%), encara que presenta taxes d'ovulació, de fecunditat i de desenvolupament embrionari fins les 48 hores similars a les observades en altres línies de conill. Una possible explicació d'aquestes pèrdues gestacionals és, potser, com a conseqüència d'uns baixos nivells de 17β -estradiol a 12 i 24 dies de gestació, que impliquen una disminució en la producció de progesterona a 24 dies. Per la seua part, els elevats nivells de IGF-I observats a 12 dies de gestació, podrien posar de manifest alteracions metabòliques en aquesta línia, podent tenir influència en les elevades pèrdues gestacionals.

Al segon experiment es va estudiar l'efecte dels genotips embrionari i matern en les pèrdues. Els resultats mostraren que, tant la supervivència embrionaria (fins als 14 dies de gestació) com el pes de la placenta fetal, depenen de ambdós genotips, mentre que la supervivència fetal (als 25 dies de gestació) i el pes fetal són afectats pel genotip embrionari. La supervivència fetal a 25 dies de gestació va ser major per a embrions de la línia A independentment del genotip de la receptora. Per la seua banda, tant el pes fetal com el pes de la placenta fetal varen ser superiors per a la línia R. En aquest mateix experiment, es va controlar el pes de la femella (R i A) al llarg de la gestació.

Quan es va analitzar el increment de pes entre el dia 14 i el dia 25 de gestació, les femelles de la línia A presentaren majors increments. No obstant, el pes a la fi de la gestació va ser similar per ambdós línies.

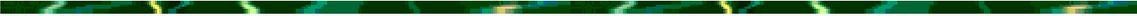
Dins del segon bloc, en el tercer experiment d'aquesta tesi es va avaluar l'expressió gènica relativa dels gens Oct4, VEGF, erbB3 i TGF- β 2 en embrions de conill en diferents etapes de desenvolupament prèvies a la implantació per a determinar el moment idoni de la valoració preimplantacional. Es varen observar diferències en l'expressió d'Oct4, VEGF i TGF- β 2, augmentant l'expressió d'estos dos últims en el sext dia de gestació, mentre que l'expressió d'Oct4 decreix a partir del quart dia. Com que Oct4 és un transcrit relacionat amb la pluripotencialitat i VEGF i TGF- β 2 estan relacionats amb fenòmens necessaris per a la implantació com són la neovascularització o proliferació cel·lular, els resultats d'aquest experiment indiquen que, a partir del quint dia de gestació, els embrions de conill disminueixen l'expressió d'Oct4 com a mecanisme intrínsec per a permetre que tinga lloc la implantació. Esta reducció en l'expressió de Oct4 observada en els dies 5 i 6 de desenvolupament preimplantacional, en contrast amb la sobre-expressió de VEGF i TGF- β 2, podria estar relacionada amb una expressió de gens relacionats amb efectes angiogènics en l'endometri matern. Per altra banda, en aquest experiment es va detectar expressió del receptor erbB3 a quatre, cinc i sis dies de desenvolupament, a pesar de no haver observat diferències en aquesta expressió en els diferents moments de desenvolupament embrionari, possiblement pel fet que la seua funció està enfocada a la diferenciació i maduració del blastocist.

Degut a que l'elecció d'un gen de referència és fundamental per obtindre resultats fiables d'expressió gènica relativa i degut que les línies de conill presenten un genotip molt diferent, en el quart experiment es va estudiar la influència del genotip de la línia en l'estabilitat del gen de referència utilitzat. Es va analitzar l'estabilitat dels dos gens de referència més empleats en embrions de conill, com són H2afz i GAPDH, així com la mitjana geomètrica de ambos mitjançant tres algorismes diferents. Posteriorment, per normalitzar les dades d'expressió gènica relativa obtinguts en embrions de ambdós línies, el genotip va ser analitzar per als gens Oct4, VEGF, TGF- β 2, erbB3 i Ifn- γ . Els

resultats obtinguts mostraren que la normalització amb GAPDH o amb la mitjana geomètrica de ambdós, són els més adequats quan s'estudia l'expressió gènica relativa d'embrions de conill independentment del genotip.

A l'últim experiment d'aquesta tesi, es va analitzar l'expressió gènica relativa dels gens Oct4, erbB3, TGF- β 2, VEGF i Ifn- γ , en endometri i embrions de ambdós línies als 6 dies de gestació, així com l'expressió relativa de gens relacionats amb la gestació i el sistema de senyalització IGF, com son IGF-I, IGF-II i els seus receptors en el mateix moment de gestació. Els resultats obtinguts únicament mostraren diferències significatives en l'expressió gènica del receptor de IGF-II, que va presentar tant en endometri como en embrions, una menor expressió en la línia R.

En conclusió, la línia de conill seleccionada per velocitat de creixement (línia R) presenta unes elevades pèrdues al llarg de tota la gestació, que podrien estar relacionades amb uns baixos nivells sèrics de 17 β -estradiol i de progesterona, a més d'uns elevats nivells de IGF-II. Per altra banda, els resultats obtinguts en relació a l'expressió gènica als sis dies de factors relacionats amb el procés implantacional no pareixen donar informació en relació a les possibles causes d'aquestes pèrdues, a excepció d'una baixa expressió del receptor IGF-IIR, tant en embrions com en teixit endometrial, la qual cosa, juntament als elevats nivells sèrics de IGF-I, podrien indicar alteracions metabòliques a la línia R.



ÍNDICES



Índice General

I. INTRODUCCIÓN	
1.1. Fisiología reproductiva de la coneja	37
1.1.1. Características generales	37
1.1.2. Fecundación	38
1.1.3. Desarrollo embrionario	38
1.1.4. Implantación y placentación	40
1.1.5. Control hormonal de la función reproductiva y de la gestación	43
1.2. Mecanismos de regulación génica	47
1.2.1. Desarrollo embrionario	48
1.2.2. Implantación	51
1.2.3. Placentación	56
1.3. Factores determinantes de la supervivencia prenatal	58
1.3.1. Factores genéticos	59
1.3.2. Factores no genéticos e interacción con el genotipo	60
1.3.2.1. Balance energético	61
1.3.2.2. Alteraciones y síndromes metabólicos	64
II. OBJETIVOS	67
III. EXPERIMENTOS REALIZADOS: Aspectos Comunes	71
3.1. Estudio de las pérdidas gestacionales en una línea de conejo seleccionada por velocidad de crecimiento	75
3.1.1. Resumen	77
3.1.2. Introducción	78
3.1.3. Material y métodos	80
3.1.4. Resultados	83
3.1.5. Discusión	85
3.1.6. Bibliografía	90

3.2. Efecto del genotipo embrionario y materno en la supervivencia embrionaria y fetal	97
3.2.1. Resumen	99
3.2.2. Introducción	100
3.2.3. Material y métodos	101
3.2.4. Resultados	105
3.2.5. Discusión	109
3.2.6. Bibliografía	113
3.3. Expresión diferencial de ARN mensajero en embriones <i>in vivo</i> preimplantacionales de conejo	117
3.3.1. Resumen	119
3.3.2. Introducción	120
3.3.3. Material y métodos	122
3.3.4. Resultados	125
3.3.5. Discusión	126
3.3.6. Bibliografía	129
3.4. Estudio del efecto del genotipo embrionario en la selección del gen de referencia para la normalización de la PCR cuantitativa a tiempo real	135
3.4.1. Resumen	137
3.4.2. Introducción	138
3.4.3. Material y métodos	140
3.4.4. Resultados	144
3.4.5. Discusión	147
3.4.6. Bibliografía	149
3.5. Análisis de la expresión de ARN mensajero de genes candidatos relacionados con las pérdidas gestacionales en blastocistos y tejido endometrial	153
3.5.1. Resumen	155
3.5.2. Introducción	156

3.5.3. Material y métodos	158
3.5.4. Resultados	163
3.5.5. Discusión	167
3.5.6. Bibliografía	170
IV. DISCUSIÓN GENERAL	177
V. CONCLUSIONES	189
VI. BIBLIOGRAFÍA	193

Índice de Figuras

Figura 1	Fotografía del aparato reproductor de la coneja	38
Figura 2	Fotografía de embriones de conejo en diferentes estadios de desarrollo	39
Figura 3	Fotografía de embriones recuperados a 72 horas con capa de mucina	40
Figura 4	Esquema de estructuras generadas durante la implantación	41
Figura 5	Fotografía de feto y placentas a 25 días de gestación	43
Figura 6	Niveles hormonales antes y después de la monta en hembras pseudogestantes	45
Figura 7	Niveles hormonales durante la gestación	47
Figura 8	Factores relacionados con la calidad y diferenciación embrionaria	49
Figura 9	Presencia y funciones de TGF- β en diferentes tipos celulares	52
Figura 10	Mecanismos de señalización de VEGF	54
Figura 11	Fotografía de hembras adultas de las líneas R y A	73
Figura 12	Fotografía de procedimiento de laparoscopia de diagnóstico	81
Figura 13	Fotografía de procedimiento de transferencia embrionaria	103
Figura 14	Fotografía de feto y placentas en cuerno uterino	104
Figura 15	Fotografía de placentas en regresión en cuerno uterino a 25 días de gestación	104
Figura 16	Expresión relativa de Oct4 (A), VEGF (B), TGF- β 2 (C) y erbB3 (D) en embriones <i>in vivo</i>	126
Figura 17	Expresión relativa de Oct4 (A), VEGF (B), Ifn- γ (C), TGF- β 2 (D) y erbB3 (E) según método de normalización	145
Figura 18	Expresión relativa de VEGF, erbB3, Ifn- γ , TGF- β 2 y Oct4 en blastocistos	164
Figura 19	Expresión relativa de VEGF, erbB3 e Ifn- γ en endometrio	165
Figura 20	Expresión relativa de IGF-I, IGF-II, IGF-IR e IGF-IIR en blastocistos	166
Figura 21	Expresión relativa de IGF-I, IGF-II, IGF-IR e IGF-IIR en endometrio	166
Figura 22	Modelo de las interacciones entre hormonas y el sistema IGF en las funciones placentarias	187

Índice de Tablas

Tabla 1	Factores de transcripción relacionados con la pluripotencialidad	50
Tabla 2	Efecto de la línea genética y la lactación en el tamaño de camada	83
Tabla 3	Efecto de la línea genética y la lactación en las pérdidas gestacionales	84
Tabla 4	Efecto de la línea genética y la lactación en los niveles hormonales	85
Tabla 5	Variables y covariables utilizadas	105
Tabla 6	Tasas de ovulación, fecundación y desarrollo embrionario	106
Tabla 7	Tasas de implantación a 14 días en transferencias recíprocas	106
Tabla 8	Número de fetos vivos a 25 días en transferencias recíprocas	107
Tabla 9	Pesos de fetos y placentas a 25 días de gestación	108
Tabla 10	Pesos, coeficientes de grasa perirrenal e incremento de peso en hembras	109
Tabla 11	Cebadores específicos utilizados y características	124
Tabla 12	Cebadores específicos utilizados y características	141
Tabla 13	Parámetros de la curva estándar de genes de referencia	144
Tabla 14	Valores de estabilidad para genes de referencia	144
Tabla 15	Cebadores específicos utilizados y características	163
Tabla 16	Tasa de ovulación, diámetro de blastocistos y pérdidas gestacionales en líneas A y R	164

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMP: Adenosín monofosfato

ANOVA: Análisis de la varianza

ARN: Ácido ribonucleico

Ct: Ciclo umbral

cDNA: ADN complementario

DP: Diferencia de peso

eCG: Gonadotrofina coriónica equina

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EI: Embriones implantados

ELISA: Ensayo directo inmunoenzimático

erbB3: Receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico

FSH: Hormona folículo-estimulante

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GH: Hormona de crecimiento o somatotropina

GnRH: Hormona liberadora de gonadotrofina

GR: Coeficiente de grasa perirrenal

hCG: Gonadotrofina coriónica humana

H2afz: Gen histona

Hprt1: Hipoxantina fosforibosiltransferasa 1

Ifn: Interferón

IGF: Factor de crecimiento similar a insulina

IGFBP: Proteínas de unión a IGF

IO: Inducción de la ovulación

LH: Hormona luteinizante

LOS: Síndrome de descendencia grande

MCI: Masa celular interna

MMP: Metaloproteinasas de matriz

MUC-1: Mucina tipo 1

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

nNOS: Óxido nítrico sintasa neural

NV: Nacidos vivos

PC: Peso de la hembra receptora

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PF: Peso fetal

PGF: Prostaglandina

PPM: Peso de la placenta materna

PPF: Peso de la placenta fetal

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real

TI: Tasa de implantación

TC: Tamaño de camada

TFV: Número total de fetos vivos

TGF: Factor de crecimiento transformante

TIMP: Inhibidores de MMP

TO: Tasa de ovulación

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

Ywhaz: tirosín 2-monooxigenasa/triptófano proteína de activación 5-monooxigenasa, polipéptido Z

I. INTRODUCCIÓN



El conejo es un mamífero polítoco de interés ganadero, con características peculiares en su fisiología reproductiva que, por otra parte, muestra similitudes con la especie humana. Se trata de un animal de fácil manejo que presenta ovulación inducida, pudiendo ser establecida con bastante precisión la cronología de los procesos de ovulación, fecundación e implantación. Además, el desarrollo embrionario, el tipo de implantación y el de placentación que presenta son similares a las de humanos. Todas estas características hacen de esta especie un modelo biomédico muy utilizado para estudiar los mecanismos de implantación y placentación, así como para evaluar los efectos ambientales, farmacológicos o de los medios y técnicas utilizados en los procesos de biotecnología reproductiva.

1.1. Fisiología reproductiva

1.1.1. Características generales

La coneja es un mamífero polítoco que no presenta ciclo estral hasta el momento en que es inducida a ovular. A diferencia de otras especies de mamíferos, la ovulación se produce no sólo como consecuencia del desarrollo folicular sino que además, requiere del estímulo del coito. Sin embargo, presenta una alternancia entre fases de aceptación y no aceptación de la monta, que está relacionada con el desarrollo y la atresia de folículos pre-ovulatorios responsables del aumento de los niveles de estradiol, desencadenando el reflejo de lordosis, característico del estado de receptividad (Lefèvre y Caillol, 1978; Enkhuizen, 1980).

Anatómicamente, presenta un aparato reproductor con dos cuernos uterinos (útero bicorne) que desembocan de forma independiente en la vagina (figura 1). Si se produce la fecundación de los óvulos y la posterior implantación embrionaria, se inicia una gestación de 30-31 días. Además, la coneja es capaz de aceptar la monta de forma natural inmediatamente después del parto con lo que se iniciaría una nueva gestación, que podría solaparse con el período de lactancia (García-Ximénez, 1991). Si no se produce la fecundación o bien, los embriones no llegan a implantarse en el útero, la

coneja inicia un período de pseudogestación equivalente a un ciclo de 16-17 días, tras el que los cuerpos lúteos son reabsorbidos y la hembra vuelve a estar receptiva, aceptando la monta natural y pudiendo ovular de nuevo.



Figura 1. Aparato reproductor de una coneja a 12 días de gestación donde se observan 13 embriones implantados.

1.1.2. Fecundación

En el conejo, el esperma se deposita en la zona superior de la vagina. Al igual que en otros mamíferos, la fecundación se producirá en el ámpula entre 14 y 18 horas después de la monta o inseminación (Thibault, 1975), siendo el tiempo óptimo para la capacitación del semen en el útero de 16-18 horas (Seitz *et al.*, 1970) y la vida media fértil de un ovocito alrededor de las 16 horas post-coito (Adams y Chang, 1962).

1.1.3. Desarrollo embrionario

En todas las especies de mamífero, una vez el ovocito es fecundado, el cigoto comienza a sufrir las divisiones propias de la segmentación. Brackett *et al.* (1972) establecieron la cronología de estas divisiones *in vivo*, demostrando que la formación del segundo corpúsculo polar y la posterior formación de ambos pronúcleos tienen lugar alrededor

de las 14-18 horas post-coito. La primera segmentación se observa entre las 21 y 25 horas (figura 2), seguida de las siguientes segmentaciones con un intervalo entre ellas de alrededor de 4 y 8 horas. Sin embargo, existe un grado de asincronía elevado en el desarrollo embrionario ya en estas etapas tempranas (Orgebin-Crist, 1967; Soupart, 1972).

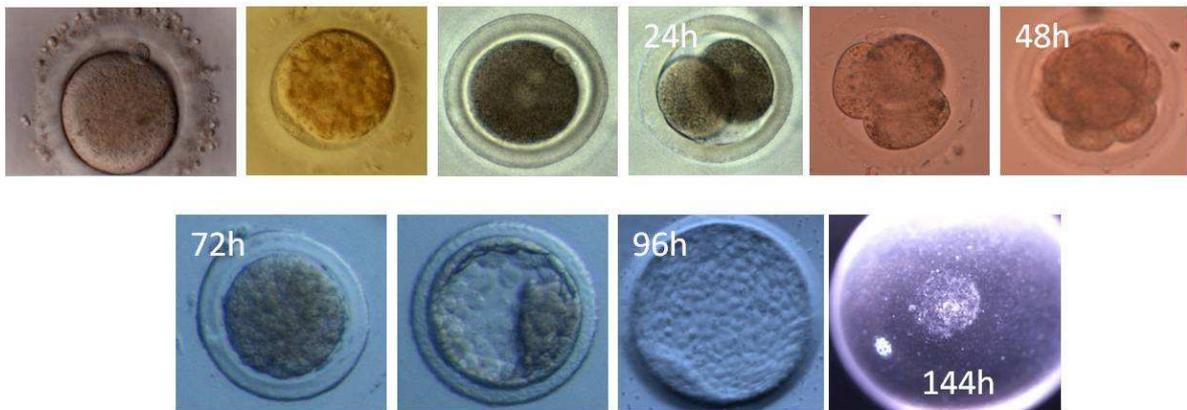


Figura 2. Fotografías de embriones de conejo desarrollados in vitro en diferentes etapas, desde la expulsión del corpúsculo polar, la formación de ambos pronúcleos y las diferentes divisiones que se producen hasta los estadios de mórula y blastocisto.

A partir de las 60 horas después de la fecundación, se inicia la compactación (figura 2), de forma que los blastómeros más exteriores se transforman en células epiteliales prismáticas, que están unidas entre sí por medio de desmosomas (mórula). La formación de la blástula o cavidad interior del blastocisto suele observarse alrededor de las 70 horas después de la monta (figura 2), momento en el que el embrión pasa al cuerno uterino (Takeishi *et al.*, 1963), donde tendrá lugar la implantación en el séptimo día de gestación. En este período previo al proceso de adhesión, el blastocisto aumenta entre 20 y 30 veces su diámetro.

El blastocisto presenta dos grupos celulares. Por un lado, la masa celular interna (MCI) o embrioblastema, que dará lugar al embrión y, por otro, el resto de células que formarán el trofoblasto o trofoectodermo y que darán lugar a tejidos no embrionarios, cuya misión será la de establecer contacto físico con el útero materno. Además, el blastocisto de conejo presenta una característica peculiar a nivel de sus cubiertas que consiste en la presencia de una segunda cubierta situada sobre la zona pelúcida y

denominada cubierta de mucina (figura 3), formada por glicoproteínas y cuya función podría ser de inmunosupresión local durante el desarrollo embrionario (Oliphant *et al.*, 1984).

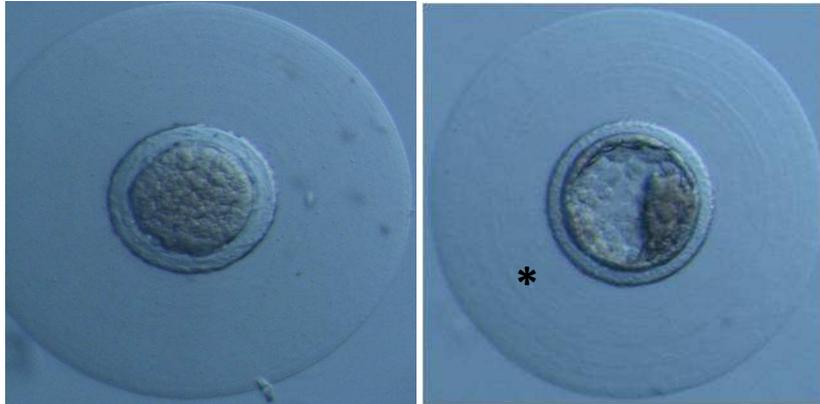


Figura 3. Fotografía de embriones recuperados a las 72 horas de gestación, donde se observa la capa de mucina (*).

Alrededor de los cuatro días y medio la zona pelúcida, fundamental para el posterior desarrollo del blastocisto, se transforma progresivamente para formar la neozona. Posteriormente, se deposita alrededor de esta neozona un nuevo material mucoproteico, formando una nueva capa, el gliolema. De esta forma, el blastocisto presenta finalmente tres capas con diferente origen. La más externa, el gliolema que parece derivar de las secreciones uterinas, la capa situada en el medio que parece representar restos de la capa de mucina, y la última capa, la neozona, que podría estar formada por secreciones del trofoblasto, o bien, por secreciones uterinas que han difundido a través de las otras capas, situándose en la zona más interna (Denker, 2000). Las principales funciones que se han postulado para estas capas son facilitar el espaciamiento de los blastocistos en el cuerno uterino en el momento de la implantación e inmovilizar y orientar a éstos en los lugares de implantación (Böving, 1972).

1.1.4. Implantación y placentación

La implantación es el mecanismo por el cual el embrión se adhiere al epitelio endometrial estableciendo diferentes interacciones con éste. Este fenómeno presenta distintas etapas, de las que la primera de ellas es la aposición del embrión en el

epitelio endometrial hacia el quinto día después de la fecundación. Posteriormente, entre los días sexto y séptimo llega la segunda etapa, denominada fase de adhesión en la que el embrión establecerá una conexión física con el endometrio. En este momento, en respuesta al blastocisto, el epitelio subyacente y el endometrio sufren cambios (decidualización) por los que el endometrio se agranda para formar una cámara de implantación, la decidua, para acomodar al embrión en desarrollo. Finalmente, se produce una colonización del endometrio por parte de las células trofoblásticas, que proliferan para dar lugar al sincitiotrofoblasto, rompiendo la lámina basal endometrial e invadiendo los vasos sanguíneos maternos (Hadley, 1997; Hoffman *et al.*, 1998). Los pliegues endometriales placentarios se hipertrofian y los no placentarios se atrofian (Hafez y Tsutsumi, 1966). Este fenómeno de implantación va asociado a un aumento de la vascularización uterina, de forma que se forman nuevos vasos sanguíneos (neovascularización), al mismo tiempo que los ya existentes aumentan su grosor. A las 12 horas después de la adhesión, el endometrio mesometrial presenta ya un plexo vascular subepitelial desarrollado, lo que representa el último estadio de la etapa de preimplantación (figura 4).

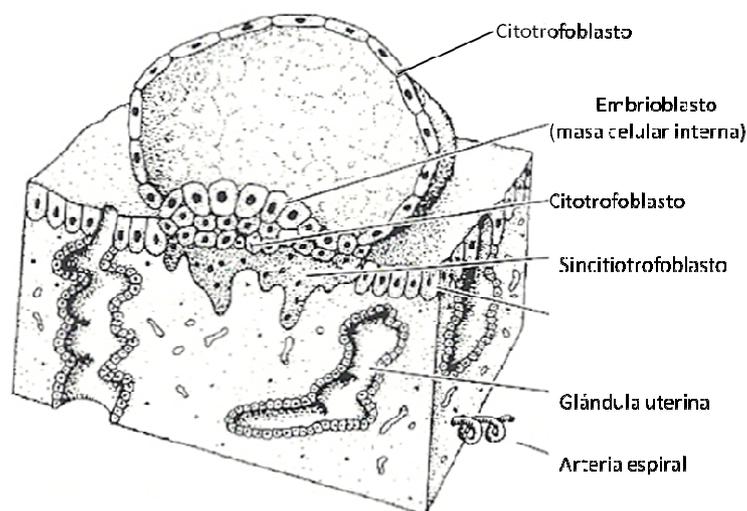


Figura 4. Figura en la que se muestran las diferentes estructuras que se generan durante la implantación embrionaria tanto en el embrión como en el epitelio uterino (Hadley, 1997).

En conejos, el primer órgano placentario que se forma es el saco placentario que, a partir del momento de la implantación, va transformándose hasta el décimo día de gestación, momento en el que se diferencia ya la placenta corialantoidea que estará

totalmente formada el día 12 de gestación (Adams, 1960; Datzler *et al.*, 1988). En el conejo, según la clasificación de Grosser (1909), esta placentación es de tipo hemocorial y es común en conejo y humano. En este tipo de placentación, la placenta presenta una única capa, de forma que sólo el endotelio de los capilares fetales separa los sistemas sanguíneos embrionario y materno, además de ser las células trofoblásticas del blastocisto las que penetran en el epitelio uterino hasta alcanzar este plexo vascular. Otra característica típica de la placentación que comparten tanto lagomorfos como roedores y humanos es el hecho de que las vellosidades se sitúan agrupadas en un área circular u ovalada, es decir, su sujeción es de tipo discoidal según la clasificación morfológica de Strahl (1905).

Los estudios morfológicos realizados en conejo han mostrado algunas diferencias respecto a otras especies. Pitt y Carney (1999) demostraron que, al contrario de lo que ocurre en roedores, en el día 13 de gestación el embrión de conejo no está totalmente envuelto y, además, la placenta muestra un crecimiento expansivo. Así, pese a que en este momento de la gestación, la placenta no está completamente formada, el embrión ya ha formado dos discos placentarios alargados. Más recientemente, Schencke *et al.* (2008) han realizado un completo estudio morfométrico de la relación embrio-uterina en conejo mediante técnicas inmunocitoquímicas, concluyendo que la causa del comienzo de los procesos apoptóticos en el endometrio podría ser una respuesta a la actividad trofoblástica. Además, los procesos de proliferación celular y apoptosis son sucesos secuenciales de forma que, durante los procesos tempranos implantacionales, el epitelio uterino sufre principalmente proliferación celular pero, a medida que avanza la implantación y debido a la interacción con el blastocisto, este epitelio comienza a sufrir fenómenos apoptóticos, coincidiendo estos dos fenómenos entre los días 7 y 10 de gestación. Esta interacción comienza con una invasión del trofoblasto, mediada por diferentes factores como metaloproteinasas de matriz (MMP), relacionadas con los procesos de degradación de la matriz extracelular, y los activadores de plasminógeno (Duc-Goiran *et al.*, 1999).

En el conejo puede diferenciarse fácilmente la placenta fetal de la materna (figura 5), que difieren en sus patrones de crecimiento de forma que, mientras que la placenta fetal aumenta de tamaño y, por tanto, de peso durante toda la gestación (al igual que

ocurre con el feto), la materna se mantiene constante (Bruce y Abdul-Karim, 1973). El útero también crecerá y aumentará su vascularización de forma progresiva. A este respecto, los estudios de Argente *et al.* (2003) demuestran que si cada unidad fetoplacentaria recibe el aporte de un único vaso sanguíneo, los pesos del feto y de las placentas materna y fetal disminuyen su peso significativamente (8%, 17% y 7%, respectivamente) respecto a las unidades que presentaban cuatro o más vasos sanguíneos. De la misma forma, Mocé *et al.* (2004) relacionan esta mayor vascularización no sólo con un incremento en estos pesos, sino también con una menor probabilidad de muerte fetal.

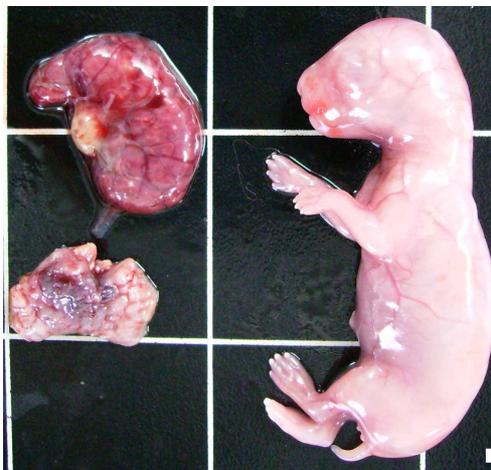


Figura 5. Fotografía de feto (derecha), placenta fetal (arriba) y placenta materna (abajo) a los 25 días de gestación.

1.1.5. Control hormonal de la función reproductiva y de la gestación

La secreción por parte del hipotálamo de GnRH está determinada por unos niveles de estradiol de alrededor de 20 pg/ml en plasma (Orstead *et al.*, 1988) y por el estímulo coital que, mediante vía aferente nerviosa, produce la secreción de este factor que provocará la liberación adenohipofisaria de gonadotrofinas, fundamentalmente LH, que desencadenará la ovulación (Eckert, 1998).

El control hormonal aparece ya al inicio de la función reproductiva, regulando el comportamiento sexual. En la coneja, esta regulación es fundamentalmente producida por los niveles de 17β -estradiol secretado por los folículos ováricos, de forma que a las seis horas del coito, la concentración de estrógenos es de alrededor de 140 pg/ml,

cantidades muy superiores a las observadas en el momento de la monta. Sin embargo, estos niveles de estrógenos se mantienen constantes a partir de este momento hasta el séptimo de gestación, mientras que los niveles de progesterona presentan un pico a las dos horas después del coito (76 ng/ml), para después situarse en torno a los 10-12 ng/ml entre el día sexto y séptimo de gestación (Kahn-Dawood y Yusoff-Dawood, 1984). Se produce una liberación masiva de LH que ocurre a partir de los 20-120 min post-coito pero no tanto de FSH, ya que los estrógenos inhiben la secreción de esta última, mientras que la progesterona inhibe la descarga de LH, sin tener efecto sobre la descarga de FSH (Harper, 1961; Davidson, 1969; Spies *et al.*, 1997). A lo largo de la gestación, los niveles sanguíneos tanto de FSH como de LH son bajos, aunque suficientes para que nuevos folículos crezcan y, por tanto, produzcan estrógenos para el mantenimiento de los cuerpos lúteos (Miller y Keyes, 1978).

Durante los dos primeros tercios de la gestación, la hormona más importante para el mantenimiento de la misma es el 17 β -estradiol (Shaikh y Harper, 1972). Sin embargo, sus niveles no son constantes, sino que experimenta dos picos, uno justo antes de la implantación y otro a los 15 días de gestación (Blandau, 1961; Miller y Keyes, 1978). Los embriones de conejo son capaces de producir estradiol desde etapas muy tempranas, ya que son capaces de convertir estrona en estradiol desde el estadio de cigoto hasta el de blastocisto (Wu y Williams, 1986). Por otra parte, el endometrio materno también presenta capacidad de producción de estradiol, que comienza en el tercer día de gestación (Wise y Heap, 1983).

Orstead *et al.* (1988) realizaron un estudio de los niveles hormonales desde 10 días antes de la monta hasta alrededor del día 22 en conejas pseudogestantes, demostrando que el pico de FSH a las pocas horas de la monta sitúa los valores plasmáticos de ésta alrededor de 4 ng/ml, para bajar posteriormente a niveles basales de 1 ng/ml a lo largo de la pseudogestación, y los niveles de progesterona aumentan, situándose alrededor de 20-30 ng/ml entre los días 6 y 12 de pseudogestación (figura 6).

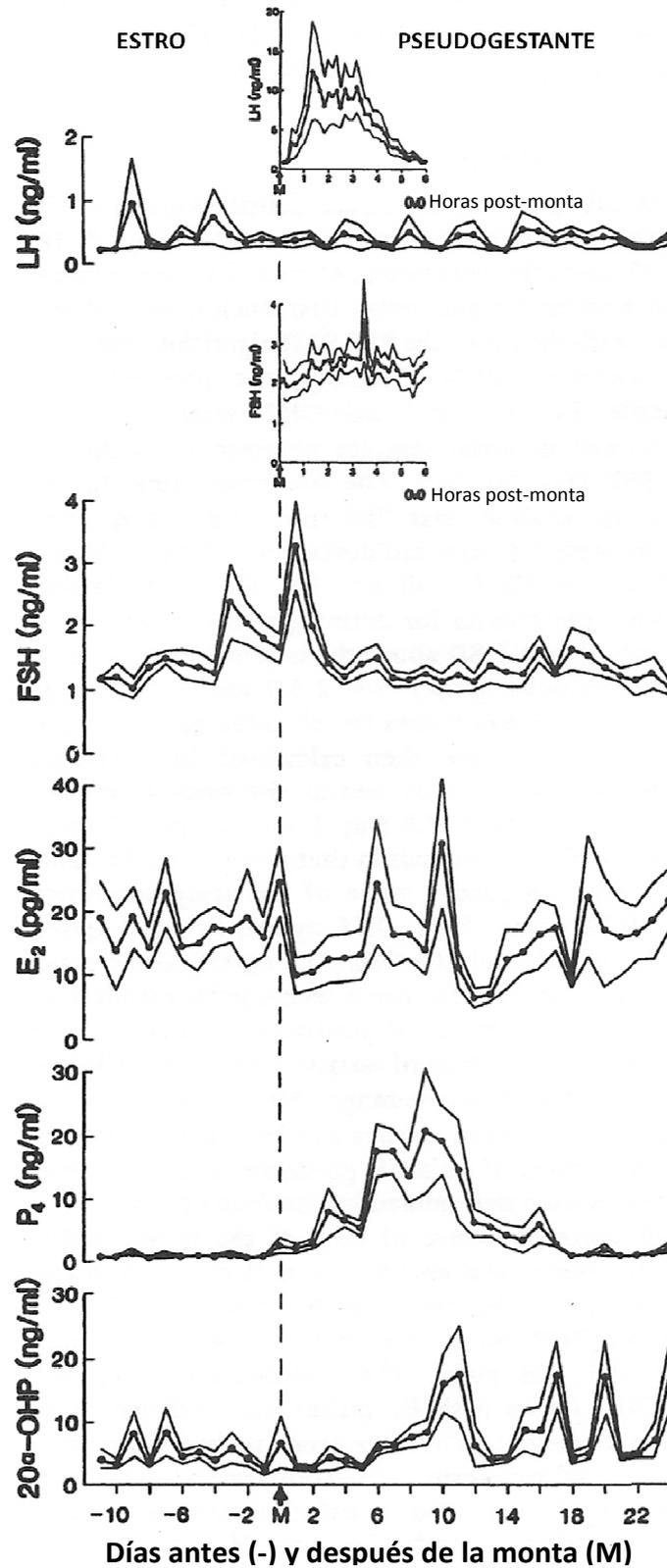


Figura 6. Niveles plasmáticos de hormona luteinizante (LH), hormona foliculo estimulante (FSH), 17β-estradiol (E₂), progesterona (P₄) y 20α-hidroxiprogesterona (20α-OHP) en muestras diarias obtenidas en conejas antes (-) y después de la monta (M) con machos vasectomizados (adaptado de Orstead et al., 1988).

El estradiol es necesario tanto para el proceso de diferenciación embrionaria como para el de implantación (Niemann *et al.*, 1989), de forma que Gadbsy *et al.* (1983) demostraron que, en ausencia de estrógenos, la placenta no tiene actividad luteotrófica directa. Además, son indispensables para el mantenimiento de la actividad de los cuerpos lúteos en conejas gestantes, de forma que la influencia de los estrógenos en la estimulación de la producción de progesterona por parte de los cuerpos lúteos comienza aproximadamente a los 5 días post-coito (Holt, 1989). Esta producción de progesterona por parte de los cuerpos lúteos depende, además, de factores relacionados con el metabolismo oxidativo. En conejas pseudogestantes, la actividad enzimática NOS se ha relacionado con los niveles luteales y plasmáticos de progesterona, de forma que una disminución de estos niveles va acompañado de un aumento en la actividad de esta enzima entre los días 15 y 18, momento en el que los cuerpos lúteos pasan de la última fase luteal al estado de cuerpo lúteo en regresión funcional (Boiti *et al.*, 2004). Gobbetti *et al.* (1999) demostraron que el óxido nítrico (NO) inhibe la producción de progesterona por parte de los cuerpos lúteos y, a su vez, la prostaglandina F-2 α (PGF2 α) regula la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Durante el desarrollo luteal, eNOS e iNOS (NOS endotelial e inducible, respectivamente) regulan la actividad de NO (Boiti *et al.*, 2003).

Los niveles de progesterona máximos se alcanzan entre los días 14 y 18 de gestación, disminuyendo a partir de ese momento y hasta el momento del parto (Spilman *et al.*, 1972; Challis *et al.*, 1974; Lau *et al.*, 1982; Munsel *et al.*, 1982; Viard y Provot, 1988; Zoldag *et al.*, 1988; Dugré *et al.*, 1989) (figura 7). Estos niveles hormonales son fundamentales para las interacciones entre embrión y endometrio, por lo que la actividad del cuerpo lúteo afecta al proceso de implantación, siendo necesaria la producción de progesterona de cuatro cuerpos lúteos como mínimo (Hafez, 1972). Además, será necesario un aumento de la concentración local de estradiol frente a la de progesterona para que la implantación se produzca correctamente.

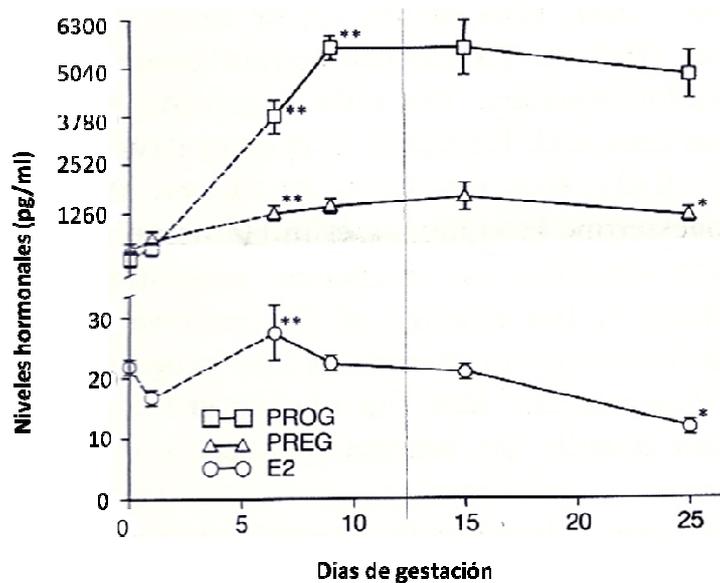


Figura 7. Niveles de progesterona (PROG), pregnolona (PREG) y estradiol (E2) durante la gestación en conejo (adaptado de Dugré et al., 1989).

Una vez se produce el parto, la concentración de progesterona se reduce drásticamente y comienza la producción de elevados niveles de prolactina. Este aumento de los niveles de prolactina parece tener relación con el aumento de estrógenos, ya que éstos estimulan la secreción de prolactina (Hilliard *et al.*, 1973; Challis *et al.*, 1974; McNeilly y Friesen, 1978). Durante la lactancia, los niveles de prolactina se mantienen gracias al estímulo del amamantamiento, siendo la producción de prolactina superior en el inicio de la lactación.

1.2. Mecanismos de regulación génica

En la última década, el desarrollo de las técnicas de RT-PCR, qRT-PCR, microarrays, ultrasecuenciación y transgénesis ha permitido abordar el estudio de los mecanismos de regulación génica de diferentes procesos fisiológicos. A menudo, estos mecanismos son complejos y los mecanismos de regulación génica en el proceso gestacional no son una excepción, ya que comprenden un gran número de transcritos y de interacciones entre ellos, que pueden ser diferentes según la especie o el momento de la gestación.

A continuación se comentan algunos de estos transcritos y sus funciones en momentos concretos del proceso gestacional.

1.2.1. Desarrollo embrionario

Como ya se ha indicado, para una correcta implantación 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, para dar lugar más adelante a los diferentes tipos celulares que conformarán un ser vivo.

Esta pérdida de pluripotencialidad por parte del trofoblasto es fundamental para la posterior adhesión y está regulada por un gran número de factores, tanto epigenéticos como reguladores de la transcripción. Entre estos factores, se les ha dado una mayor importancia a dos de ellos, el gen Oct4 (perteneciente a la familia génica POU) y el gen Nanog, expresándose ambos 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). La relación entre estos factores es compleja. La figura 8 muestra un esquema de cómo algunas de ellas inhiben o activan diferentes procesos del desarrollo embrionario. En la tabla 1 (página 50) se muestran algunos de los genes más relacionados con la pluripotencialidad celular y el fenotipo que se obtiene bien al perder la funcionalidad de dicho transcrito (organismo *knock-out*) o bien cuando el gen que codifica para ese factor se inserta en células indiferenciadas (*stem cells*).

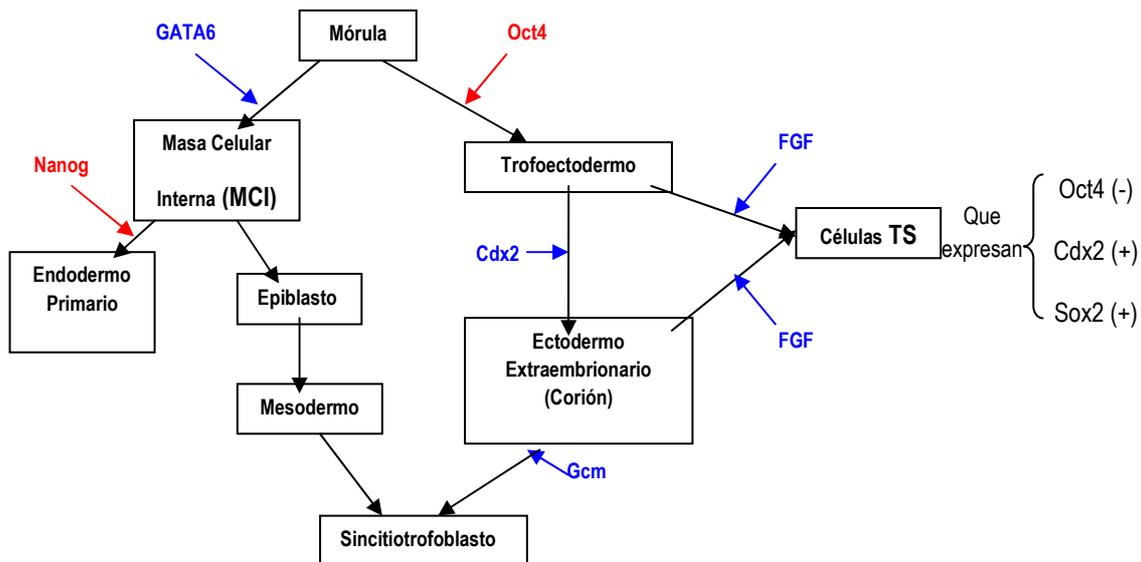


Figura 8. Relaciones de algunos factores relacionados con el desarrollo embrionario y con la diferenciación celular de un cigoto de ratón. Aparecen en rojo los transcritos que inhiben la ruta y en azul, los que la activan (adaptado de Roberts et al., 2004).

De estos factores, el Oct4 es el expresado de forma más temprana y es fundamental para el desarrollo preimplantacional, relacionándose con procesos de diferenciación celular en distintas especies de mamíferos (Nichols *et al.*, 1998; Pesce *et al.*, 1998; Hansis *et al.*, 2001; Fair *et al.*, 2004; Dode *et al.*, 2006). 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 la diferenciación celular y el desarrollo embrionario temprano (Smith *et al.*, 2007). Por ejemplo en ratones, tanto su expresión como el resultado proteico de ésta se han encontrado en ovocitos cuyos núcleos estaban en división, mientras que en blastocistos en expansión, tanto el ARN mensajero como la proteína se encontraban exclusivamente en la masa celular interna, tejido todavía pluripotente (Fair *et al.*, 2004; Dode *et al.*, 2006). Por otro lado, el Oct4 es producido por células indiferenciadas embrionarias (*stem cells*), 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). En conejo, Kobolak *et al.* (2009) han demostrado su expresión tanto en células del trofoectodermo, como en las de la masa celular interna, aunque estas últimas presentan una expresión superior, probablemente debido a que las células del trofoectodermo ya han comenzado su diferenciación.

Tabla 1. 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.

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	PIT-Oct-Onc	Oocito, embrión fertilizado, células germinales, masa celular interna (ICM), epiblasto, células de carcinoma embrionario, células indiferenciadas (Stem cells)	Letal en blastocisto, 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 blastocisto, pérdida de epiblasto, diferenciación de ICM en ectodermo 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 de 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

1.2.2. Implantación

En la adhesión al epitelio uterino intervienen un gran número de productos de transcripción entre los que se encuentran factores de crecimiento, moléculas de adhesión y citoquinas. Estas moléculas son importantes ya que, en este punto, es necesario no sólo que el blastocisto siga desarrollándose sino que, además, debe tanto adherirse al endotelio endometrial como evitar el ataque del sistema inmunitario de la hembra. Por su parte, el endotelio endometrial junto con las células trofoblásticas deben ir desarrollando estructuras nuevas, las placentas materna y fetal, que intervendrán en la producción de factores reguladores de la gestación, como progesterona y otros factores de crecimiento (Staun-Ram y Shalev, 2005; Bazer *et al.*, 2008). Algunos de estos factores de crecimiento pueden afectar a la maduración y diferenciación de los blastocistos, actuando también en la interacción útero-embriónica durante la implantación como se mostrará en el apartado siguiente. Uno de estos factores, es la superfamilia de factores de crecimiento transformante (TGF, del inglés, “Transforming growth factor”), cuyos miembros están directamente relacionados con el desarrollo y diferenciación celular como son la remodelación epitelial y los procesos de crecimiento, diferenciación y funcionalidad de la placenta. El factor TGF- β regula eventos de diferenciación y maduración de los blastocistos, además de modular las interacciones entre útero y embrión durante la implantación (Paria y Dey, 1990; Pauken y Capco, 1999). Este factor TGF- β , al igual que el TNF- α o diferentes interleucinas, son reguladores de proteinasas y peptidasas implicadas en el proceso de implantación, que son las encargadas de provocar la degradación y transformación del tejido endometrial y favorecer la presencia de receptores y moléculas de adhesión. De esta forma, elementos reguladores relacionados con TGF, como el elemento inhibidor de TGF- β , se han identificado en los promotores de varios genes codificadores de metaloproteinasas de matriz (MMP, del inglés “Matrix metalloproteases”) (Puente *et al.*, 2005). En la figura 9, se muestran componentes de la superfamilia TGF y otros factores relacionados con el proceso implantacional, entre los que se encuentran diferentes proteinasas relacionadas tanto con la implantación como con el proceso siguiente, la placentación.

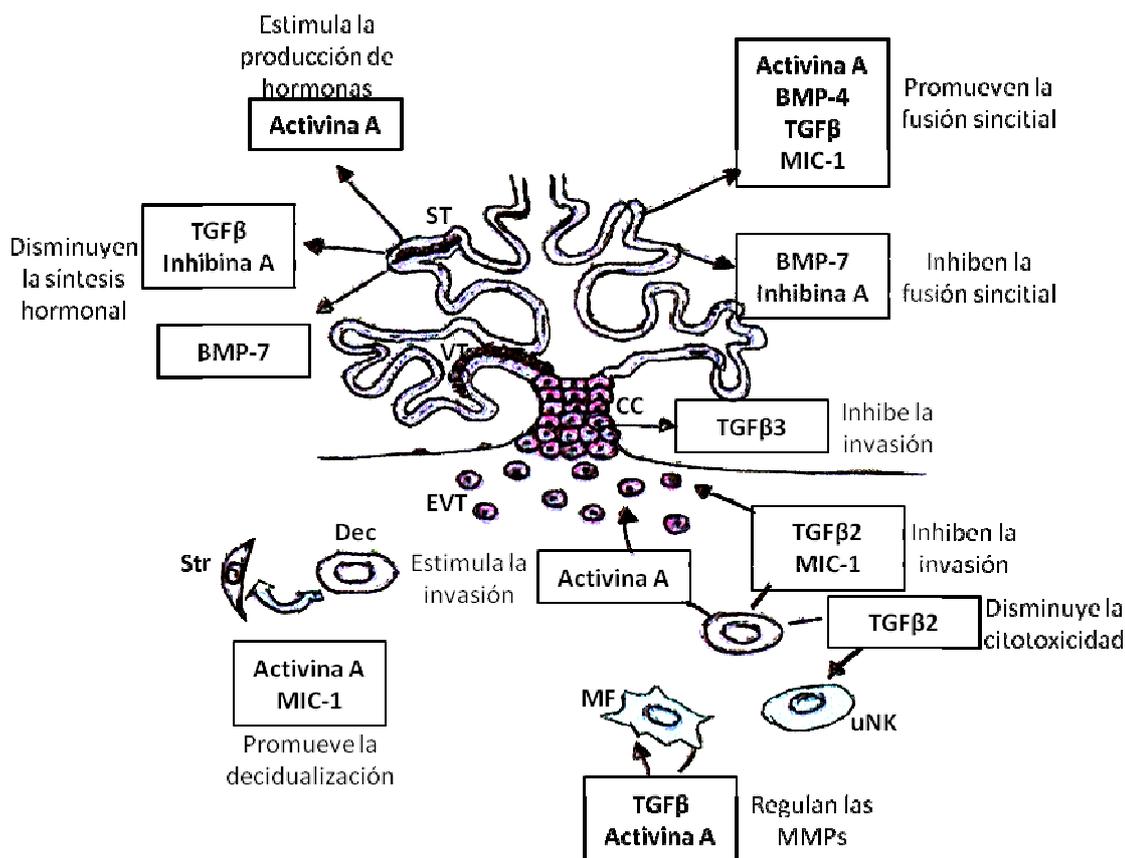


Figura 9. Presencia y función de TGF- β en diferentes tipos celulares relacionados con la implantación, así como la relación de esta molécula con otras que también presentan funciones importantes durante este proceso; ST: sincitiotrofoblasto, VT: capa interior vellosidades del citotrofoblasto; MIC-1: citoquina inhibidora de macrófagos; Str: células del estroma; Dec: células de la 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).

Existen tres grupos de proteinasas con una especial relevancia durante la implantación, las metaloproteinasas de matriz (MMP), los activadores de plasminógeno y las catepsinas. Existen diferentes tipos de MMP cuya expresión en trofoblasto y endometrio se ha relacionado con la remodelación decidual y la diferenciación del estroma materno, como muestran estudios realizados con inhibidores de éstas o TIMP (Behrendtsen *et al.*, 1992; Harvey *et al.*, 1995; Alexander *et al.*, 1996). Más recientemente, en líneas seleccionadas de conejo, Estellé *et al.* (2006) han demostrado la importancia de un polimorfismo en TIMP-1 en el desarrollo y supervivencia embrionaria *in vivo* a partir de las 62 horas de desarrollo, de forma que hembras seleccionadas por baja capacidad uterina, que presentaban unas mayores pérdidas previas a la implantación, expresaban un 35% menos de TIMP-1 en oviducto.

Los activadores de plasminógeno están implicados en la degradación de la matriz endometrial durante la invasión tisular y la remodelación en útero, de forma que su presencia aumenta en endometrio a partir del séptimo día de gestación en las zonas cercanas a las regiones donde los embriones están implantando (Wang *et al.*, 1966). Por último, la tercera familia de proteinasas, las catepsinas (tipos B y L) se relacionan con la invasión del endometrio por parte del trofoblasto (Babiarz *et al.*, 1992).

Existen otros factores relacionados con el fenómeno de implantación como la laminina, el colágeno IV y la fibronectina, de importancia en la digestión de diferentes moléculas de la matriz (Lah *et al.*, 1989; Guinec *et al.*, 1993). Las mucinas y en concreto, la MUC-1, parecen tener una especial relevancia en conejo, donde se ha observado que la pérdida durante el proceso de implantación de esta mucina endometrial ocurre sólo en los lugares donde tiene lugar el proceso decidual, es decir, en los lugares de implantación. Además, su expresión está regulada de forma esteroideogénica (Hoffman *et al.*, 1998), de modo que el estradiol estimula su expresión y la progesterona bloquea esta estimulación en ratón (Surveyor *et al.*, 1995).

La osteopontina es una fosfoproteína secretada por la matriz y que podría estar relacionada con la regulación de señalización de eventos relacionados con la adhesión, además de la invasión por parte del trofoblasto y su migración (Johnson *et al.*, 2003). Esta fosfoproteína está regulada, mediante AMP cíclico, por la progesterona y el estradiol, aunque su expresión depende de otros factores (Craig y Denhardt, 1991). Diferentes estudios han demostrado que su expresión en el endometrio durante la gestación no requiere la presencia de un embrión implantado. Sin embargo, la expresión de sus receptores (miembros de la familia de las integrinas) se da únicamente en los lugares de implantación en conejo (Illera *et al.*, 2003). La presencia de estos receptores para osteopontina tanto en blastocistos como en trofoblasto humano (Campbell *et al.*, 1995) y la abundancia de osteopontina en la decidua durante la gestación parecen indicar un posible papel en eventos relacionados con la decidualización y la migración e invasión del trofoblasto durante los procesos de implantación, placentación, angiogénesis y neovascularización.

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, del inglés “Vascular endotelial growth factor”), 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 acorde al desarrollo embrionario durante la implantación en humanos. En la figura 10 se muestra un esquema de los mecanismos de señalización en los que 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. Los diferentes sistemas de señalización de VEGF en la interfaz útero-placentaria y su interacción mediante sistemas de proteínas quinasas mitógeno activadoras (MAP, del inglés “Mitogen activation protein”) del sistema enzimático óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) incrementan la concentración de óxido nítrico (NO), relacionado con múltiples sistemas metabólicos.

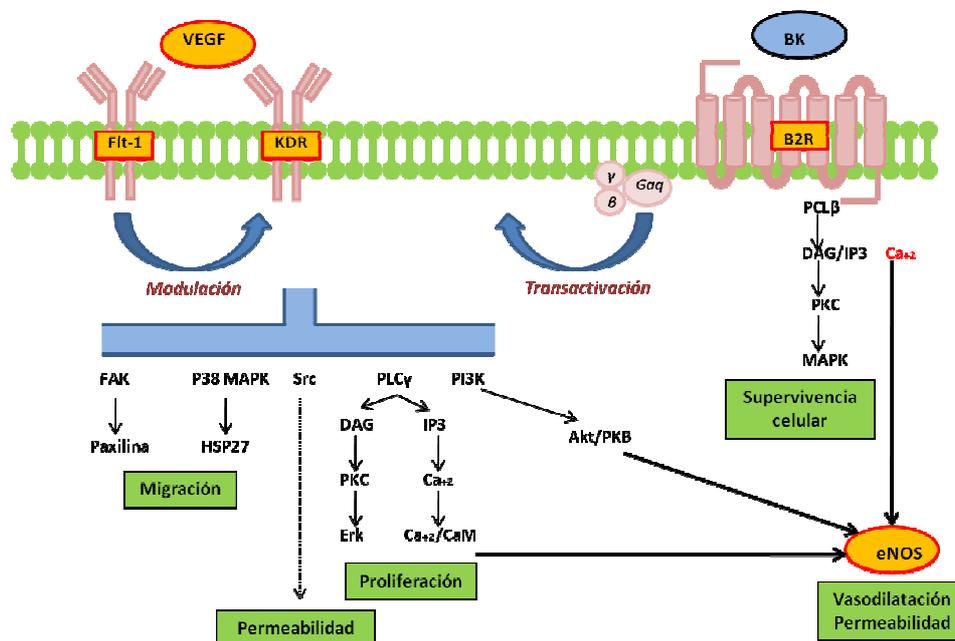


Figura 10. Mecanismos de señalización en los que el VEGF contribuye al fenómeno de angiogénesis y su participación en el desarrollo de la interfaz útero-placentaria mediante cambios proliferativos, invasivos, de vasodilatación y de permeabilidad, esenciales para la invasión celular y angiogénesis; VEGF: 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: proteína 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 Valdés *et al.*, 2008).

Otro factor de crecimiento relacionado con los procesos de implantación y adhesión es el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés "Epidermic growth factor"). El EGF comprende una familia de factores relacionados con la implantación, de forma que promueven la proliferación y diferenciación en embrión y útero (Tamada *et al.*, 1999). Esta familia está formada por siete ligandos y cuatro receptores con actividad tirosín-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 implantacional es muy conocida. En concreto, se han encontrado receptores de EGF en embriones de distintas especies de mamíferos, como en rata, ratón y humano (Pringent *et al.*, 1992; Johnson y Chatterjee, 1993; Brown *et al.*, 2004).

El reconocimiento materno-embriionario incluye la expresión de diferentes citoquinas observadas en numerosas especies (Sharkey, 1998). El embrión sintetiza factores que previenen la activación local de células citotóxicas y estimulan la producción de citoquinas (Linnemeyer y Pollack, 1993). Algunas de estas citoquinas son los interferones que pueden clasificarse en dos familias, interferones de tipo I y II. La familia de interferones de tipo II está compuesta por un único gen conocido, cuyo producto es el interferón γ (De Maeyer y De Maeyer-Guignard, 1988), considerado el producto primario de las células T y que se han encontrado en diferentes tipos celulares, desde trofoblasto porcino (Lefèvre y Boulay, 1990) hasta en células de la placenta o de membrana embrionaria humanas (Aboagye-Mathiesen *et al.*, 1995; Bazer *et al.*, 1997). El otro grupo de interferones, los de tipo I, está compuesto por diferentes subtipos con propiedades biológicas similares y, probablemente, con un mismo receptor. En este grupo 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 diferentes especies (Bazer *et al.*, 2008). El caso más claro y estudiado es el del interferón τ en rumiantes, sintetizado por el embrión, que actúa 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.*, 1998) 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 (Godornes *et al.*, 2007; Kawasaki *et al.*, 1992). En concreto, el interferón ω e interferón γ se han relacionado con la implantación en conejo (Chalier *et al.*, 1993; Muscettola *et al.*, 2003).

Es importante destacar que la expresión de estos factores está íntimamente relacionada con el control hormonal, de forma que los esteroides actúan mediante receptores intracelulares ligados a factores de regulación génica (Evans *et al.*, 1998; Beato, 1989; Wang *et al.*, 1991). La progesterona media la expresión de muchos genes durante la gestación y, en muchos casos, la respuesta es dependiente y está mediada por estrógenos. De hecho, el inicio y final de la ventana receptiva del útero requiere una sensibilización por parte de la progesterona, además de una preparación del útero, llevada a cabo por los estrógenos (Finn y Hofmann, 1990). La progesterona regula factores como citoquinas, factores de crecimiento, proteinasas, inhibidores de proteinasas, factores angiogénicos y componentes de la matriz extracelular endometrial (Funk y DeMayo, 1998).

1.2.3. Placentación

Indudablemente, los factores que regulan o están relacionados de alguna forma con el fenómeno de implantación, tienen también una gran importancia en la placentación. Éstos estarán relacionados con el aporte de nutrientes al embrión por parte de la hembra, además del crecimiento tanto de éste como de los tejidos placentarios y endometriales. A nivel celular, los primeros cambios que se producen en el endometrio materno se han estudiado principalmente en diferentes especies de roedores, además de algunos estudios realizados en humanos, concluyendo que los fenómenos más importantes son fenómenos de apoptosis y proliferación celular (Galán *et al.*, 2000; Aplin y Kimber, 2004).

Muchos de los genes que intervienen en el fenómeno de implantación son los responsables de la regulación de los procesos de apoptosis y proliferación celular necesarios durante la placentación. Factores de crecimiento como EGF o TGF- β se relacionan de forma fundamental con esta regulación (Jones *et al.*, 2006). Durante el proceso de placentación, diferentes autores coinciden en que la familia de factores de crecimiento similares a la insulina son unos de los reguladores más importantes, por lo que se les dará especial atención a continuación.

Los factores de crecimiento similares a la insulina I y II (IGF-I e IGF-II, del inglés 'Insulin growth factor') son polipéptidos con secuencias parecidas a la insulina (Rinderknecht y Humbel, 1978) que presentan propiedades mitogénicas, de forma que inducen la proliferación y crecimiento en células somáticas, además de presentar importancia en la regulación del transporte de aminoácidos y glucosa en la placenta (Ashton y Spencer, 1983; Kniss *et al.*, 1994). El receptor tipo I (IGF-IR) es una glicoproteína tetramérica transmembrana que se asemeja al receptor de insulina y que presenta una alta afinidad tanto por IGF-I como por IGF-II (Ullrich *et al.*, 1986; Germain-Lee *et al.*, 1992). Por el contrario, el receptor tipo II (IGF-IIR) es un polipéptido de simple cadena que presenta una alta afinidad por el IGF-II, pero no es capaz de unirse al IGF-I o a la insulina (Liu *et al.*, 1993). Sus carencias presentan resultados muy dispares a nivel funcional ya que, mientras estudios con ratones "knock-out" para el IGF-IIR presentan un excesivo crecimiento placentario y fetal (Lau *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994), estudios en humanos han demostrado que mutaciones en el gen que codifica para el IGF-IR dan como resultado una reducción de la funcionalidad del mismo, asociada con un bajo crecimiento tanto pre- como postnatal (Abuzzahab *et al.*, 2003). Estos resultados demuestran que los IGF, junto con sus receptores, tienen un importante papel en la regulación del crecimiento fetal y placentario (Wilson *et al.*, 1982). Por otro lado, Fant *et al.* (1986) demostraron que la placenta produce tanto IGF-I como IGF-II y que, además, éstos presentan acciones como reguladores locales del crecimiento. En concreto, IGF-II se expresa de forma mayoritaria en la placenta, presentando funciones tanto paracrinas como autocrinas, especialmente importantes durante la implantación y la invasión trofoblástica (Hamilton *et al.*, 1997; Giudice, 1998). Además, la

sobreexpresión de IGF-II en humanos produce el síndrome de Beckwith-Wiedemann, relacionado directamente con desórdenes de excesivo crecimiento fetal y postnatal (Murrell *et al.*, 2004).

Pero estos factores de crecimiento similares a la insulina no sólo están relacionados con el crecimiento fetal y placentario, sino que diferentes cascadas de señalización reguladas por IGF promueven tanto la proliferación como la diferenciación celular (O'dell y Day, 1998; Kitamura *et al.*, 2003; Clemmons y Maile, 2005). Estudios con embriones preimplantacionales de ratón muestran que una disminución de IGF-IR induce la apoptosis mediante una cascada de señalización transduccional, lo que se traduce en un aumento de las reabsorciones embrionarias (Chi *et al.*, 2000). Estudios similares demostrando la relación entre factores IGF y las pérdidas embrionarias se han realizado en otras especies como rata, cerdo o humano (Katagiri *et al.*, 1997; Pinto *et al.*, 2002; Sferruzzi-Perri *et al.*, 2006 y 2007).

Por último, el último grupo perteneciente a la familia de IGF es el grupo de las proteínas de unión a IGF (IGFBP, del inglés 'Insulin like growth factor binding protein'), grupo numeroso que en humanos, comprende hasta 6 elementos diferentes (Denley *et al.*, 2005). De éstas, la IGFBP-1 desfosforilada se ha encontrado en el suero de hembras gestantes (Westwood *et al.*, 1994), mientras que la IGFBP-3 es producida por la placenta y las membranas fetales (Han, 1996; Rogers *et al.*, 1996). Su función es, principalmente, la regulación de los IGF inhibiendo las funciones de éstos, como la proliferación y diferenciación celular, además de la migración trofoblástica (Ritvos *et al.*, 1988; Irving *et al.*, 1995; Halmilton *et al.*, 1997; Gleeson *et al.*, 2001).

1.3. Factores determinantes de la supervivencia prenatal

Las pérdidas a lo largo de la gestación se han estimado alrededor de un 14% desde el momento de la fecundación hasta el inicio del proceso de implantación, alrededor del séptimo día post-coito (Tao y Niemann, 2000; Santacreu *et al.*, 2005) y, a partir de este momento hasta el parto, se han estimado en torno al 20% (Adams, 1960; Blasco *et al.*,

1994). Además de la influencia de la línea genética o estirpe del animal en estas pérdidas, en este apartado se abordarán otros factores como el manejo reproductivo, la alimentación o el estrés. Por último, se estudiarán factores metabólicos que, causados o no por los anteriores, pueden modificar la supervivencia embrionaria y fetal.

1.3.1. Factores genéticos

El efecto de factores genéticos en la supervivencia prenatal ha sido estudiado en diferentes especies como conejos (Torres *et al.*, 1987; Bolet y Theau-Clément, 1994), cerdos (Wilson *et al.*, 1998) y ratones (Ernst *et al.*, 2000), utilizando en muchas ocasiones la técnica de transferencia embrionaria. Aunque en general, los resultados no son concluyentes, algunos autores en estudios en ratón (Bradford, 1979; Pomp *et al.*, 1989) y en vacuno (Klindt y Maurer, 1986) concluyen que la supervivencia embrionaria y el crecimiento prenatal dependen, en gran medida, del genotipo materno. No obstante, otros autores indican que el genotipo embrionario y, sobre todo, la interacción entre ambos genotipos también influye en la supervivencia embrionaria, el crecimiento embrionario y placentario en ratón (Hetherington, 1971; Al-Murrani y Roberts, 1978), cerdo (Ashworth *et al.*, 1990; Biensen *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998) y conejo (Mocé *et al.*, 2004).

Los criterios de selección en conejo suelen ser el tamaño de camada y la velocidad de crecimiento (ganacia de peso diaria durante el cebo) con el fin de aprovechar la complementariedad de estos caracteres en el sistema de producción. La relación genética entre ambos se ha abordado mediante la estimación de parámetros genéticos o bien, de las respuestas correlacionadas a la selección por tamaño de camada (Bünger *et al.*, 2005). Las correlaciones genéticas entre el crecimiento y los parámetros reproductivos presentan estimas genéticas bajas y de ambos signos (Camacho y Baselga, 1990; Gómez *et al.*, 1998; Garreau *et al.*, 2000).

Otro criterio de selección utilizado en animales plóticos y en concreto, en conejo, es la capacidad uterina, relacionada con el espacio disponible para cada feto, característica que afecta al desarrollo fetal y, por tanto, a la supervivencia prenatal. Bruce y Abdul-Karim (1973) demostraron que la posición del feto en el útero influía en el peso tanto de la placenta como del feto, de forma que fetos con posiciones más cercanas al ovario presentan ratios peso fetal/peso placentario menores que los fetos situados en posiciones más avanzadas. Estudios en especies no plóticas han demostrado que un espacio uterino insuficiente o, lo que es lo mismo, un exceso de embriones puede desembocar en pérdidas fetales (Ginther, 1989; Allen, 1992; Dziuk, 1992). En conejo, este factor se ha estudiado desde el punto de vista de la hembra, utilizando la capacidad uterina como criterio de selección y demostrando que la selección divergente puede afectar a la supervivencia embrionaria. Los trabajos de Blasco *et al.* (1994) y Argente *et al.* (1997) realizados con hembras ovariectomizadas unilateralmente mostraban una baja supervivencia embrionaria y unas correlaciones genéticas elevadas entre el tamaño de camada y la supervivencia embrionaria, aunque esta correlación era baja respecto a la supervivencia fetal. De esta forma, estos mismos autores demostraron que la selección por una elevada capacidad uterina estaba relacionada con un mayor peso ovárico, mayores tasas de ovulación y longitud uterina, pero implica una disminución tanto del peso fetal como del peso de la placenta fetal, así como una mayor supervivencia embrionaria (Argente *et al.*, 2003a y 2003b). Del mismo modo, Mocé *et al.* (2004) demostraron que la selección divergente afecta a la supervivencia a lo largo de toda la gestación, siendo la supervivencia embrionaria (hasta los 17 de gestación) y fetal (hasta los 28 días de gestación) mayor en hembras seleccionada por capacidad uterina. Peiró *et al.* (2007) demostraron que hembras seleccionadas por alta capacidad uterina presentaban una mayor supervivencia embrionaria a partir de las 62 horas de gestación, además de mayores tasas de desarrollo (mayor número de mórulas tanto tempranas como compactas) a partir de las 48 horas de gestación.

1.3.2. Factores no genéticos e interacción con el genotipo

Además de los factores innatos al animal como su genotipo, existen otros factores que son capaces de alterar y modificar la supervivencia prenatal. Entre los más importantes

están aquellos que afectan al balance energético de la coneja, como la alimentación, el manejo reproductivo y el estrés, que incluso puede introducir desequilibrios hormonales. Por último, la fisiología reproductiva se ve afectada por alteraciones patológicas o síndromes metabólicos que podrían estar desencadenados por los factores anteriores *per se* o al interaccionar con determinados genotipos.

1.3.2.1. Balance energético

Determinar los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento, gestación y lactación no es fácil, pese a que es bien conocido que las necesidades energéticas se incrementan y varían durante la gestación entre un 25-50% (Fortun-Lamothe, 2006). Mientras que en las tres primeras semanas de gestación, éstos son bajos y el balance energético es positivo (Parigi-Bini *et al.*, 1990), al final de la gestación las necesidades aumentan al mismo tiempo que la ingesta de alimento disminuye en los días previos al parto, de forma que se obtiene un balance energético negativo (Fortun-Lamothe, 2006).

Se han estudiado diferentes tipos de dietas con el fin de determinar la composición más adecuada de las mismas durante la gestación. De esta forma, dietas altas en fibra aumentan la producción lechera (Nizza *et al.*, 1997; Pascual *et al.*, 2002) y disminuyen la movilización de grasas en la hembra (Xiccato *et al.*, 1999), sin afectar al intervalo entre partos ni a la vida útil de la hembra (Pascual *et al.*, 2002). Dado que en otras especies, aumentar la energía obtenida con la dieta algunos días antes del coito da buen resultado (Ebling y Foster, 1991; Fink *et al.*, 1998; Khireddine *et al.*, 1998), se han realizado algunos estudios para comprobar si este efecto positivo ocurría también en conejos, sin obtener resultados concluyentes. Mientras que el aumento de energía en la dieta 10 días antes del coito en hembras multíparas lactantes aumentó su fertilidad (Fortun-Lamothe, 1998), si este aumento se realizaba cuatro días antes, no se observaba ningún efecto (Maertens, 1998). Dietas con alto contenido en grasa aumentan la producción de leche y, por tanto, la movilización de reservas, mientras que dietas ricas en almidón limitan esta movilización (Pascual *et al.*, 2003). Por otro

lado, algunos autores han estudiado el efecto de una malnutrición o carencias de determinados nutrientes en la capacidad reproductiva, de forma que deficiencias en algunos oligoelementos (Cu, Zn, I) que actúan como reguladores metabólicos pueden producir pérdidas embrionarias (Graham *et al.*, 1995). A este respecto, se ha demostrado que un balance energético negativo por malnutrición puede afectar al desarrollo folicular, la calidad del ovocito, el proceso de fecundación e, incluso, al desarrollo embrionario en etapas tempranas (Butler y Smith, 1989; Vanroose *et al.*, 2000; Foxcroft *et al.*, 2006).

Un ejemplo de balance energético negativo tiene lugar cuando se utiliza un sistema de manejo intensivo en el que la hembra solapa casi totalmente gestación con lactación. Diferentes autores concuerdan en que el sistema intensivo y, por tanto, el solape entre gestación y lactación provoca una fuerte movilización de reservas en la hembra que ésta no puede subsanar, lo que da lugar a un balance energético negativo que puede producir deficiencias no sólo en la fertilidad, sino también en el tamaño de camada final (Maertens y Okerman, 1988; Cervera *et al.*, 1993). Este efecto también se produce con un manejo semi-intensivo y es especialmente importante en hembras primíparas lactantes (Rebollar *et al.*, 2009). Fortun-Lamothe y Prunier (1999) demostraron la existencia de una correlación negativa entre los niveles de prolactina y progesterona, lo que podría indicar que las hembras lactantes presentaban menores tasas de supervivencia fetal debido al balance energético desfavorable en éstas. Sin embargo, otros estudios no han observado diferencias en los niveles de progesterona entre hembras lactantes y no lactantes (Fortun-Lamothe y Bolet, 1995; Mocé *et al.*, 2002). Lin *et al.* (1988) demostraron, mediante estudios *in vitro*, que la hiperprolactinemia disminuye la secreción de progesterona por las células de la granulosa, lo que se traduce en una inhibición de la ovulación. Estudios más recientes realizados en hembras de conejo primíparas indican que la lactación influye en los folículos ováricos disminuyendo la calidad de los gametos y afectando, de este modo, a los parámetros reproductivos (Arias-Álvarez *et al.*, 2009). En concreto, la prolactina afecta a los mecanismos relacionados con el desarrollo folicular y la esteroidogénesis

ovárica que determinan una receptividad sexual, fertilidad y prolificidad inferior en hembras lactantes (Arias-Álvarez *et al.*, 2007).

Con el fin de subsanar estos problemas reproductivos derivados del solape entre gestación y lactación, se han realizado estudios en los que se pretendía disminuir este balance energético negativo, disminuyendo el período de lactación (Xiccato *et al.*, 2004). Sin embargo, esto conlleva otros problemas productivos asociados, como el aumento en problemas sanitarios de los gazapos (Pascual, 2001) e incluso, una mayor mortalidad perinatal (Rebollar *et al.*, 2009). En el mismo sentido, Rebollar *et al.* (2006) demostraron que estos parámetros reproductivos pueden mejorarse en hembras primíparas mediante la separación transitoria de la camada previa a la inseminación artificial. Para mejorar estos parámetros reproductivos aumentando el balance energético durante el solape entre lactación y gestación, se han propuesto estrategias nutricionales basadas en dietas ricas en fibra durante la gestación, incrementando de esta forma la capacidad de ingestión ya que presentan menor digestibilidad y aumentan la velocidad de tránsito intestinal (Nicodemus *et al.*, 1999; Rebollar *et al.*, 2008). Sin embargo, en conejas primíparas alimentadas con piensos ricos en lignina, pese a que se ha observado un aumento en el consumo de alimento, no ha mejorado la composición corporal en las primeras etapas de la gestación y han mostrado una mayor atresia folicular, menor número de ovocitos con maduración nuclear, un incremento en el porcentaje de ovocitos con alteraciones en los patrones de migración de gránulos corticales (degenerados o de baja calidad) y, por tanto, una menor tasa de embriones viables (Arias-Álvarez *et al.*, 2009 y 2010). Por otro lado, el hecho de que la hembra solape gestación y lactación provoca un incremento de IGF-I en su torrente sanguíneo, ya que este factor de crecimiento está relacionado, no sólo con la reproducción como se ha descrito anteriormente, sino también con el crecimiento de las células de la glándula mamaria (Xiccato *et al.*, 2005).

Por último, factores de tipo ambiental como la temperatura o el estrés pueden influir en el proceso reproductivo. Un aumento de la temperatura ambiente puede

incrementar las pérdidas gestacionales y el estrés se ha demostrado que influye en los niveles de hormonas hipotalámicas (Dobson y Smith, 1995; DelaSota *et al.*, 1998).

1.3.2.2. Alteraciones y síndromes metabólicos

El metabolismo energético de la hembra durante la gestación está íntimamente relacionado con las pérdidas que se producen a lo largo de la misma. Este metabolismo energético está regulado, en gran medida, por los factores de crecimiento similares a la insulina que tienen un efecto metabólico importante en la supervivencia tanto embrionaria como fetal, dado que son factores secretados por el embrión y por la placenta, con efectos tanto autocrinos como paracrinos. Un ejemplo de ello es la regulación de la angiogénesis por parte del IGF-II en el epitelio, incrementando la expresión de VEGF (Herr *et al.*, 2003). Por otro lado, estos factores de crecimiento parecen tener efecto en la producción de reguladores de la implantación comentados anteriormente, como las integrinas (receptores de osteopontina) (Clemmons y Maile, 2005) y factores de crecimiento como TGF- β (Li y Geng, 2010). Estudios en humanos han relacionados el IGF-I con el síndrome metabólico, caracterizado por un aumento del índice de masa corporal, hipercolesterolemia, hiperglucemia, hipertriglicemia e hipertensión, síntomas que afectan indudablemente a la función reproductiva y, por tanto, a la supervivencia embrionaria (Grundy *et al.*, 2004). Además, estudios en rumiantes han relacionado una disminución de la expresión de IGF-IIR con el Síndrome de Descendencia Grande (LOS, del inglés "Large Offspring Syndrome") en el que se incrementa tanto el peso de la descendencia como el crecimiento uterino durante la gestación (Powell *et al.*, 2006), lo que puede dar lugar a pérdidas en las últimas etapas gestacionales por la falta de espacio disponible para cada feto, como se ha descrito anteriormente.

Otra hormona íntimamente relacionada con funciones reproductivas es la leptina, hormona reguladora de la obesidad. Estudios con ratones homocigotos para una mutación en el gen que codifica para la leptina (gen *ob*) muestran que éstos presentan obesidad e infertilidad (Zhang *et al.*, 1994). De hecho, la leptina tiene efectos

inhibitorios en la producción de IGF-I (Agarwal *et al.*, 1999), mediados vía óxido nítrico (NO, del inglés 'Nitric oxid'), aumentando la producción de 17 β -estradiol por parte de las células de la granulosa (Huang *et al.*, 2005), debido a la inhibición de la actividad aromatasa por parte de la leptina y del NO (Chun *et al.*, 1995; Masuda *et al.*, 1997; Yamauchi *et al.*, 1997). Dado que el estradiol es el principal factor luteotrófico en conejo, esta regulación tendría especial importancia en dicha especie, donde un exceso de leptina podría desencadenar problemas en la ovulación, o bien, en la calidad de los óvulos producidos. Además, el estudio realizado por Huang *et al.* (2005) demuestra que este efecto inhibitorio por parte de la leptina de la producción de IGF-I se ve atenuado cuando se administran inhibidores del enzima NO sintasa (NOS).

Existen tres isoformas diferentes de NOS, NOS neural (nNOS), NOS inducible (iNOS) y NOS endotelial (eNOS), de las que las dos últimas se expresan en células de la granulosa de rata (Matsumi *et al.*, 1998), ratón (Mitchell *et al.*, 2005) y humano (Van Voorhis *et al.*, 1994). Nisoli *et al.* (2003) en un estudio con ratones deficientes en eNOS que presentaban una menor tasa metabólica y una ganancia de peso acelerada, demostraron que NO regula la inhibición de la proliferación celular y, además, este NO generado por eNOS controla la biogénesis mitocondrial y el balance energético corporal, lo que significa que ratones deficientes en esta isoforma de la enzima NOS presentan un menor número de mitocondrias, menor gasto energético, mayor ganancia de peso, resistencia a la insulina e hipertensión (Giordano *et al.*, 2002), características estas últimas que se asemejan a los síntomas del síndrome metabólico (Ford *et al.*, 2002). Estos problemas metabólicos podrían intervenir o tener relación con problemas en el transporte de lípidos, glucógeno o glucosa que dificultan el proceso reproductivo. Así, Boyd y Hamilton (1952) demostraron que una acumulación de glucógeno y lípidos en el endometrio materno puede dificultar la gestación. Posteriormente, Battaglia y Meacham (1969) consiguieron disminuir la mortalidad post-implantacional en ratones mediante un tratamiento con clorpropamida, un hipoglucémico utilizado en hembras diabéticas. Más recientemente, Ramin *et al.* (2010) han demostrado que en conejas diabéticas de tipo I, el desarrollo embrionario se retrasa, aumenta el número de células apoptóticas en blastocistos de 6 días y se

reduce la expresión del receptor de insulina (IR) y del IGF-IR. Esto indica que la desregularización del sistema IGF y el metabolismo de la glucosa en embriones tempranos podrían ser causante de subfertilidad y pérdidas embrionarias.

II. OBJETIVOS



- Caracterizar las pérdidas durante la gestación y los niveles hormonales en una línea de conejo seleccionada por velocidad de crecimiento.

- Estudiar la influencia de los genotipos embrionario y materno en las pérdidas gestacionales.

- Comparar la expresión génica relativa de genes candidatos relacionados con el desarrollo embrionario y la implantación en conejo, con el fin de determinar:
 - La expresión relativa de genes relacionados con el desarrollo embrionario y el proceso de implantación, como son Oct4, VEGF, erbB3, TGF- β 2 e Ifn- γ en blastocistos y endometrio de conejos de la línea R, seleccionada por velocidad de crecimiento.

 - La expresión relativa de factores de crecimiento similares a insulina, como son IGF-I, IGF-II, IGF-IR e IGF-IIR en blastocistos y endometrio de conejo de esta misma línea.

III. EXPERIMENTOS REALIZADOS

Aspectos comunes

Para todos los experimentos de esta tesis, se utilizaron animales de una línea paternal y otra maternal (línea control). La línea paternal o línea R (figura 11) es una línea sintética constituida en 1990 mediante la fusión de dos líneas paternas, una fundada en 1976 y basada en conejos de raza California criada por granjeros valencianos y otra fundada en 1981 con conejos de una línea paternal especializada (Estany *et al.*, 1992). Desde su fundación, el criterio de selección ha sido la ganancia media diaria desde el destete hasta el sacrificio (28-63 días). La línea maternal o línea A (figura 11) está basada en conejo Neozelandés blanco y seleccionada desde 1979 mediante un índice de selección familiar por tamaño de camada en el destete (Estany *et al.*, 1989).



Figura 11. Fotografía de hembras de la línea R (izquierda) y línea A (derecha) en las jaulas con gazapos todavía no destetados.

Todos los animales se mantuvieron en jaulas individuales en régimen de 16 horas de luz y 8 de oscuridad al día, con dieta comercial *ad libitum* y libre acceso a agua.

Todos los procedimientos que incluyen animales han sido aprobados por el Comité Ético de la Universidad Politécnica de Valencia. Los animales se manejaron según los principios de cuidado animal publicados en el Real Decreto español 1201/2005 (BOE: boletín oficial del estado español).

Todos los productos químicos, a menos que se indique lo contrario, fueron adquiridos a Sigma-Aldrich Química SA (Alcobendas, Madrid, España).

Experimento 3.1

**Este trabajo ha sido publicado parcialmente en la revista "Theriogenology" con la siguiente referencia: Vicente JS, Llobat L, Viudes-de-Castro MP, Lavara R, Baselga M, Marco-Jiménez F, 2012. Gestational losses in a rabbit line selected for growth rate. Theriogenology 77, 81-88.*



3.1. Estudio de las pérdidas gestacionales en una línea de conejo seleccionada por velocidad de crecimiento

3.1.1. Resumen

La muerte prenatal puede ser debida a diversos factores genéticos y ambientales, que alteran el normal desarrollo embrionario, el ambiente materno que sustenta la fecundación, el desarrollo embrionario, placentario y fetal, o afectar a la relación entre el embrión y el endometrio. El objetivo del presente trabajo fue estudiar las pérdidas gestacionales y los niveles séricos de progesterona, 17β -estradiol e IGF-I en una línea de conejo seleccionada por velocidad de crecimiento (línea paternal, R). En este estudio, se ha utilizado como línea genética de referencia, una línea maternal, línea A, caracterizada reproductivamente con anterioridad. Se realizaron un total de 211 laparoscopias, determinando el número de cuerpos lúteos, número de embriones implantados a los 12 días de gestación, número total de nacidos y número de nacidos vivos por hembra. Con el fin de analizar los niveles endocrinos, se recogió sangre de 54 animales gestantes a 12 y a 24 días (27 de cada una de las líneas utilizadas). La línea R respecto a la línea A, mostró baja inducción de la ovulación (0,70 *versus* 0,86), menor número de embriones implantados (11,3 *versus* 12,8), número de nacidos totales (7,4 *versus* 11,1) y vivos (6,4 *versus* 10,6) y, consecuentemente, unas elevadas pérdidas implantacionales (0,31), gestacionales (0,60), fetales (0,40) y perinatales (0,15). Los niveles séricos de progesterona fueron similares entre ambas líneas a los 12 días de gestación, mientras que a los 24 días, estos niveles fueron significativamente menores en la línea R (4,8 *versus* 8,2 ng/ml). Los niveles séricos de 17β -estradiol fueron superiores en la línea A tanto a 12 como a 24 días de gestación (14,6 *versus* 26,5 pg/ml, y 12,9 *versus* 21,3 pg/ml para las líneas R y A, respectivamente). Los niveles de IGF-I sólo presentaron diferencias estadísticamente significativas a 12 días (237 *versus* 149 ng/ml para la línea R y A, respectivamente). Las elevadas pérdidas encontradas a lo largo de toda la gestación en la línea R podrían ser explicadas por los bajos niveles de 17β -estradiol y el posible efecto inhibitorio que esto puede tener en la producción

de progesterona. En esta línea, son necesarios futuros estudios sobre la producción de esteroides y su biodisponibilidad durante el estro y la gestación, relacionándolos con la actividad metabólica.

3.1.2. Introducción

La mortalidad prenatal es un suceso que se ha observado en todas las especies de mamíferos, pero existen diferencias significativas en la cantidad y el momento en el que ocurre. Caracterizar y definir las causas de estas pérdidas gestacionales es importante tanto desde el punto de vista biológico, para entender el motivo por el que las pérdidas prenatales persisten a pesar de la selección natural para una reproducción eficiente, como desde un punto de vista práctico, utilizando este conocimiento para aumentar la supervivencia embrionaria (Wilmut *et al.*, 1986).

La muerte prenatal puede deberse a factores genéticos o bien, a factores ambientales que pueden alterar el desarrollo embrionario normal, el ambiente materno adecuado para sustentar la fecundación, el desarrollo del embrión, de la placenta y del feto, o afectar a la relación embrio-uterina (Bazer *et al.*, 1990; Pope *et al.*, 1990). En conejo, las pérdidas entre la fecundación y la implantación (alrededor del séptimo día de gestación) se han estimado en torno a un 14% (Tao y Niemann, 2000; Santacreu *et al.*, 2005). Pese a la variabilidad entre genotipos, en general la tasa de fecundación suele ser elevada, situándose alrededor del 95% (Adams, 1960; Bolet y Theau-Clément, 1994; Santacreu *et al.*, 1996; Peiró *et al.*, 2007). Se ha planteado que las pérdidas embrionarias tempranas pueden ser el resultado de una asincronía entre el desarrollo embrionario y el ambiente uterino debido a un patrón esteroideogénico inadecuado (Yoshinaga, 1988) o bien, a una inapropiada distribución de los embriones en el interior uterino (Hoffman *et al.*, 1998).

Las pérdidas posteriores a la implantación se han estimado alrededor del 20% en conejo (Adams, 1960; Blasco *et al.*, 1994). Después de la implantación, el desarrollo

fetal y placentario está influenciado por factores endocrinos primarios como la progesterona, factores de crecimiento similares a insulina (IGF), estradiol o prostaglandinas (Crossey *et al.*, 2002; Spencer *et al.*, 2004; Seshagiri *et al.*, 2009), pese a que existen otros factores que pueden afectar a estas pérdidas, como la respuesta inmunológica (Pandian *et al.*, 1988; Bergeron *et al.*, 1996), la suficiente neovascularización y el aporte nutritivo en el útero (Adams, 1960; Hafez y Tsutsumi, 1966; Argente *et al.*, 2003; Mocé *et al.*, 2004), y la disponibilidad de espacio uterino para cada embrión (Argente *et al.*, 2008). En conejo, el momento crucial para la supervivencia fetal se sitúa entre los días 8 y 17 de gestación, cuando la placenta hemocorial ha terminado su desarrollo y la nutrición del feto comienza a ser controlada por la placenta (Adams, 1960). El segundo pico en la mortalidad se sitúa entre los días 17 y 24, momento en el que sucede la ampliación del útero, aumentando la tensión en el embrión y, por otro lado, disminuyendo el aporte sanguíneo por parte de los vasos sanguíneos maternos (Hafez y Tsutsumi, 1966). El tercer y último pico de pérdidas tiene lugar durante la última semana de gestación, cuando los requerimientos energéticos para el crecimiento fetal aumentan rápidamente, mientras que la ingesta de alimento decrece en los días previos al parto (Fortun-Lamothe, 2006).

Las diferencias genéticas en pérdidas prenatales se han estudiado en profundidad en especies polítopas (revisión de Brien, 1986; revisión de Blasco *et al.*, 1993) y, más recientemente en ratón (Holt *et al.*, 2004), conejo (Argente *et al.*, 2003; Mocé *et al.*, 2004) y cerdo (Foxcroft *et al.*, 2006; Freking *et al.*, 2007). Bünger *et al.* (2005) sugirieron una relación negativa (aunque pequeña) entre el crecimiento y la reproducción en especies ganaderas, pese a que advierten de la insuficiente precisión en las estimas de estos parámetros. En este sentido, las estimas de las correlaciones genéticas en conejo son inconsistentes, ya que hay estudios que muestran tanto estimas positivas como negativas, probablemente, como consecuencia de la línea genética estudiada, así como del criterio de selección utilizado (Camacho y Baselga, 1990; Rochambeau *et al.*, 1994; Gómez *et al.*, 1998; Garreau *et al.*, 2000; García y Baselga, 2002).

Además, otros factores como la lactación, la nutrición o el estrés pueden provocar un balance energético y/o endocrino desfavorable en la hembra, aumentando los fallos en el proceso de fecundación, adhesión y placentación, o reduciendo el flujo sanguíneo uterino y el desarrollo fetal. De este modo, la lactación tiene un efecto en el detrimento de la receptividad, tasa de gestación y viabilidad prenatal (embrionaria y fetal) (Hafez e Ishibashi, 1965; Fortun-Lamothe *et al.*, 1993; Fortun-Lamothe y Bolet, 1995; Fortun-Lamothe, 2006). El efecto de estrés por calor en la formación de los blastocistos fue descrito por Wolfenson y Blum (1988) y la alimentación se ha relacionado con la calidad ovocitaria y el desarrollo embrionario y fetal, por la deficiente producción de factores derivados de las reservas energéticas, que afecta al soporte endocrino de la gestación y el flujo sanguíneo uterino (Brechia *et al.*, 2005; Cappon *et al.*, 2005; Fortun-Lamothe, 2006; Arias-Álvarez *et al.*, 2009).

El objetivo de este experimento ha sido estudiar las pérdidas durante la gestación y los niveles séricos de progesterona, 17β -estradiol e IGF-I en una línea de conejo seleccionada por velocidad de crecimiento.

3.1.3. Material y métodos

Animales

Para este estudio se utilizaron hembras de las líneas R y A, utilizando a estas últimas como control, dado que sus componentes de tamaño de camada y pérdidas gestacionales ya habían sido caracterizadas en estudios anteriores (García y Baselga, 2002). Se utilizaron hembras multíparas entre el tercer y sexto parto que se llevaron a la monta un mínimo de dos veces con machos pertenecientes a su misma línea genética, y asignados mediante genealogía para controlar la consanguinidad. En el momento de la monta, se anotó si la hembra estaba en período de lactación (lactante) o ya habían finalizado dicho período (no lactante).

Procedimiento de laparoscopia y definición de caracteres

Doce días después de la monta, las hembras fueron anestesiadas mediante una inyección intramuscular de 4 mg/Kg de Xilacina (Rompún, Bayer AG, Leverkusen, Alemania), seguida de una inyección intravenosa de 0,4 ml/ Kg de peso de clorhidrato de ketamina (Imalgène 500, Merial SA, Lyon, Francia) con la finalidad de mantener a las hembras anestesiadas durante la laparoscopia. Se realizaron un total de 211 laparoscopias (figura 12) en el transcurso de las cuales se anotaron el número de cuerpos lúteos y embriones implantados. Además, tras el parto, se anotó el tamaño de camada (TC) y el número de gazapos vivos al nacimiento (NV).



Figura 12. Laparoscopia de diagnostico gestacional para el recuento de cuerpos lúteos y embriones implantados.

La inducción de la ovulación (IO) se calculó como la proporción de hembras con cuerpos lúteos del total de hembras llevadas a la monta. Las tasas de ovulación y de implantación se estimaron tomando el número de cuerpos lúteos (TO) y el número de embriones implantados por hembra (EI). Las pérdidas implantacionales y gestacionales se calcularon como la relación entre la diferencia de la tasa de ovulación con número de embriones implantados o con tamaño de camada, entre la tasa de ovulación $((TO - EI)/TO)$ y $(TO - TC)/TO$, respectivamente). Las pérdidas fetales se definen como la relación entre la diferencia de número de embriones implantados en las hembras gestantes y el tamaño de camada respecto del número de embriones implantados $((EI -$

TC)/EI). Las pérdidas perinatales como la relación entre los gazapos vivos al nacimiento y el tamaño de camada total (NV/TC). Se anotaron los porcentajes de hembras que habían ovulado pero no presentaban embriones implantados y de hembras gestantes pero que no parieron ningún gazapo.

Niveles séricos de progesterona, 17 β -estradiol e IGF-I

La sangre se recuperó mediante un tubo Vacoutainer heparinizado (LH/Li Heparin Tube TAPVAL[®], MonLab, SL. Barcelona, España) de un total de 54 hembras gestantes a los 12 y a los 24 días de gestación (27 de la línea R y 27 de la línea A). La sangre se centrifugó a 3000g y 4°C durante 10 minutos con el fin de separar el suero, que se guardó a -80°C hasta su utilización. Los niveles séricos de progesterona (esteroide C21, preg-4-ene-3,20-diona), 17 β -estradiol e IGF-I se determinaron mediante la técnica de ensayo directo inmunoenzimático (ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante (Rabbit Progesterone Elisa Test, Endocrine Technologies, Inc. Newark, EEUU; Estradiol Elisa Ultra Sensitive Kit, DRG International, Inc. Marburg, Alemania; IGF-I Elisa Kit, Diagnostic Systems Laboratories, Inc. Texas, EEUU). La sensibilidad de cada uno de ellos fue de 0,1 ng/ml para progesterona, 1,4 pg/ml para 17 β -estradiol y de 1,1 ng/ml para IGF-I.

Análisis estadístico

Las variables fueron analizadas mediante un modelo lineal generalizado que incluyó como efectos fijos la línea (R y A), el estado de lactación (lactante y no lactante) y su interacción, mediante el paquete informático SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA, 2002). Tanto para la tasa de ovulación, como para el número de embriones implantados, nacidos vivos y nacidos totales (tamaño de camada), pérdidas implantacionales, fetales, gestacionales y perinatales, además de para los niveles séricos de progesterona, 17 β -estradiol e IGF-I, se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA). Para el estudio de la inducción de la ovulación y los porcentajes de hembras que habían ovulado pero no presentaban ningún embrión implantado, y de hembras con embriones implantados que no parieron ningún gazapo, se utilizó una regresión

Probit con distribución binomial del error, incluyendo en el modelo generalizado los mismos factores (línea y estado de lactación). Para todos los análisis, se consideró como significativo un p-valor menor de 0,05.

3.1.4. Resultados

Los pesos de las hembras de las líneas R y A fueron, respectivamente, de $6,42 \pm 0,61$ Kg y $4,62 \pm 0,32$ Kg (media \pm desviación estándar). Para ninguno de los análisis realizados, la interacción entre la línea y el estado de lactación fue significativa.

La inducción de la ovulación depende de la línea genética pero no del estado de lactación (tabla 2). Las hembras de la línea R presentaron menor inducción de la ovulación ya que, a pesar de aceptar la monta, alrededor de un 30% de ellas no ovularon ($0,70$ versus $0,86$ para las líneas R y A, respectivamente, tabla 2). En las hembras que sí habían ovulado, ni la línea ni el estado de lactación afectaron a la tasa de ovulación ($14,2$ y $13,8$ para las líneas R y A, respectivamente. Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la línea (R y A) y el estado de lactación (lactantes y no lactantes) en el tamaño de camada y sus componentes (medias estimadas \pm error estándar). ^{a,b} valores en la misma columna y factor con diferente superíndice son estadísticamente diferentes (p -valor $<0,05$). n =número de hembras.

	Inducción de la ovulación	Tasa de ovulación	Embriones implantados	Nacidos totales	Nacidos vivos
Línea					
Línea R (n)	$0,70 \pm 0,044^b$ (114)	$13,8 \pm 0,29$ (79)	$11,3 \pm 0,34^b$ (66)	$7,4 \pm 0,42^b$ (57)	$6,4 \pm 0,43^b$ (57)
Línea A (n)	$0,86 \pm 0,041^a$ (97)	$14,2 \pm 0,35$ (86)	$12,8 \pm 0,37^a$ (84)	$11,1 \pm 0,44^a$ (80)	$10,6 \pm 0,45^a$ (80)
Estado de lactación					
Lactantes (n)	$0,81 \pm 0,034$ (145)	$14,1 \pm 0,25$ (115)	$12,8 \pm 0,27^a$ (107)	$9,4 \pm 0,32$ (100)	$8,3 \pm 0,33$ (100)
No lactantes (n)	$0,77 \pm 0,056$ (66)	$13,8 \pm 0,38$ (50)	$11,3 \pm 0,43^b$ (43)	$9,1 \pm 0,51$ (37)	$8,7 \pm 0,52$ (37)

La tasa de implantación, el tamaño de camada o número total de nacidos, y el número de nacidos vivos dependen de la línea genética, de forma que las hembras de la línea R presentaron menores valores en el número de embriones implantados, número total de nacidos y número de nacidos vivos (11,3, 7,4 y 6,4 respectivamente, tabla 2) y, como consecuencia de estos valores, presentaron mayores pérdidas tanto implantacionales, como fetales, gestacionales y perinatales (0,31, 0,40, 0,60 y 0,15 respectivamente, tabla 3). Si se analizan las pérdidas implantacionales, 15 hembras presentaron una pérdida total de los embriones implantados a 12 días de gestación, siendo significativamente diferente entre las líneas genéticas ($0,17 \pm 0,042$ y $0,03 \pm 0,019$ para las líneas R y A, respectivamente. Datos no mostrados en las tablas). Desde la implantación hasta el parto, un total de 9 hembras perdieron todos los embriones implantados ($0,08 \pm 0,035$ y $0,06 \pm 0,028$ para la línea R y A, respectivamente. Datos no mostrados en las tablas). El estado de lactación afecta al número de embriones implantados y a las pérdidas perinatales, siendo éstos mayores en las hembras lactantes (12,8 y 0,15, tablas 2 y 3).

Tabla 3. Efecto de la línea (R y A) y el estado de lactación (lactantes y no lactantes) en las pérdidas gestacionales (medias estimadas \pm error estándar. ¹Pérdidas en relación a la tasa de ovulación. ²Pérdidas en relación al número de embriones implantados. ^{a, b} valores en la misma columna y factor con diferente superíndice son estadísticamente diferentes (p -valor $<0,05$). n =número de hembras.

Pérdidas				
	¹ Implantacionales	² Fetales	¹ Gestacionales	Perinatales
Línea				
Línea R (n)	$0,31 \pm 0,032^a$ (79)	$0,40 \pm 0,036^a$ (63)	$0,60 \pm 0,034^a$ (76)	$0,15 \pm 0,027^a$ (57)
Línea A (n)	$0,10 \pm 0,038^b$ (86)	$0,20 \pm 0,038^b$ (84)	$0,27 \pm 0,039^b$ (86)	$0,05 \pm 0,028^b$ (80)
Estado de lactación				
Lactantes (n)	$0,17 \pm 0,027$ (115)	$0,31 \pm 0,043$ (105)	$0,42 \pm 0,028$ (115)	$0,15 \pm 0,033^a$ (100)
No lactantes (n)	$0,24 \pm 0,042$ (50)	$0,30 \pm 0,028$ (42)	$0,45 \pm 0,043$ (50)	$0,04 \pm 0,021^b$ (37)

Los niveles séricos de progesterona en el día 12 de gestación fueron similares para las dos líneas genéticas estudiadas, pero en el día 24, estos niveles fueron significativamente menores en las hembras de la línea R (8,2 *versus* 4,8 ng/ml, tabla 4). De la misma forma, los niveles séricos de 17 β -estradiol fueron diferentes entre las dos líneas tanto a 12 como a 24 días. Sin embargo, únicamente a 12 días ambas líneas presentaron diferencias en sus niveles de IGF-I (tabla 4). Además, los niveles de IGF-I difieren según el estado de lactación de la hembra (229 *versus* 157 ng/ml para hembras lactantes y no lactantes, respectivamente).

Tabla 4. Efecto de la línea genética (R y A) y el estado de lactación (lactantes y no lactantes) en los niveles séricos de progesterona, 17 β -estradiol e IGF-I a 12 y 24 días de gestación (medias estimadas \pm error estándar). ^{a,b} valores en la misma columna y factor con diferente superíndice son estadísticamente diferentes (p -valor<0,05). n =número de hembras.

	Progesterona (ng/ml)		17 β -estradiol (pg/ml)		IGF-I (ng/ml)	
	12 días	24 días	12 días	24 días	12 días	24 días
Línea						
Línea R (n)	10,4 \pm 1,54 (27)	4,8 \pm 1,18 ^b (22)	14,6 \pm 2,78 ^b (24)	12,9 \pm 2,38 ^b (24)	237 \pm 23,7 ^a (25)	367 \pm 7,7 (24)
Línea A (n)	10,2 \pm 1,57 (27)	8,2 \pm 1,10 ^a (26)	26,5 \pm 2,73 ^a (26)	21,3 \pm 2,36 ^a (20)	149 \pm 23,3 ^b (27)	372 \pm 9,9 (20)
Estado de lactación						
Lactantes (n)	11,1 \pm 1,36 (34)	7,0 \pm 0,89 (33)	21,8 \pm 2,34 (32)	16,0 \pm 2,05 (31)	229 \pm 20,5 ^a (32)	365 \pm 7,9 (30)
No lactantes (n)	9,4 \pm 1,77 (20)	6,0 \pm 1,32 (15)	19,3 \pm 3,12 (18)	18,2 \pm 3,30 (13)	157 \pm 29,9 ^b (20)	374 \pm 10,1 (14)

3.1.5. Discusión

Las estimas de las correlaciones genéticas en conejo entre el tamaño de camada y los caracteres de crecimiento son bajas y contradictorias (Mgheni *et al.*, 1985; Camacho y Baselga, 1990; Rochambeau *et al.*, 1994; García y Baselga, 2002) y tanto el signo como la magnitud de esta correlación parecen depender del carácter reproductivo

correlacionado y de la población o línea estudiada. En estudios anteriores realizados con estas líneas, se han encontrado diferencias tanto en la tasa de ovulación como en el tamaño de camada (14,5 *versus* 13,5, y 7,6 *versus* 10,0 para línea R y A respectivamente; Cifre *et al.*, 1994; Gómez *et al.*, 1999), de forma que podemos inferir que la diferencia en las pérdidas gestacionales eran similares a las obtenidas en el presente estudio. En este experimento, se han observado pérdidas desde la ovulación hasta el día 12 de gestación de alrededor de 0,31, y de 0,40 desde el día 12 hasta el parto, además de unos bajos niveles séricos de progesterona a 24 días y de 17 β -estradiol tanto a 12 días como a 24 días de gestación. Estas diferencias en los niveles endocrinos respecto a la línea A podrían ser responsables de los fallos que ocurren en el último tercio de la gestación en la línea R. Cabe señalar que la endogamia acumulada durante el período de selección podría tener efecto en la línea R. Sin embargo, esta endogamia se ha mantenido de forma similar en ambas líneas genéticas estudiadas (Rabag y Baselga (2010) indican un coeficiente de endogamia de 0,008 por generación en la línea A), por lo que las elevadas tasas de pérdidas gestacionales en la línea R no son debidas a ésta, presumiblemente, a menos que hubiera una interacción entre endogamia y línea genética. En ambas líneas se ha demostrado el éxito del programa de selección. Gómez *et al.* (1999) muestran una respuesta por generación de 0,5 g/día de ganancia de peso diaria desde el destete hasta el sacrificio en la línea R y un aumento de peso del 118% al final del período de engorde en comparación con la línea A. Las hembras utilizadas en este experimento presentaron un peso adulto mayor en un 139% que las hembras de la línea A. García y Baselga (2002), utilizando una población criopreservada como control, obtuvieron una respuesta a la selección de 0,085 gazapos por generación y una distribución de las pérdidas gestacionales para la línea A similares a las observadas en este trabajo.

La línea R muestra problemas en la inducción de la ovulación y elevadas pérdidas gestacionales, comparándola con las observadas en la literatura para líneas de conejo. Los fallos en la inducción de la ovulación podrían ser debidos a deficiencias en el desarrollo folicular afectando a la actividad esteroideogénica o a los receptores de LH, o

bien a un inadecuado reflejo neuroendocrino en el sistema hipotálamo-hipofisario como consecuencia de una insensibilidad a los estrógenos o a una baja biodisponibilidad de los esteroides. Sin embargo, cuando las hembras de la línea R son llevadas a la monta o inseminadas artificialmente y la ovulación es inducida mediante análogos sintéticos de GnRH o mediante hCG, no se observan fallos en la inducción de la ovulación relevantes y significativos en relación con líneas maternas (Viudes-de-Castro *et al.*, 1995; Vicente *et al.*, 2003; Mehaisen *et al.*, 2004). De esta forma, podemos descartar que los fallos de ovulación sean debidos a problemas en la secreción de LH o a los receptores foliculares de ésta.

Las elevadas pérdidas gestacionales podrían estar relacionadas con los bajos niveles séricos de 17β -estradiol en la gestación. Este esteroide es un importante factor luteotrófico que, en la primera parte de la gestación, soporta el desarrollo de los cuerpos lúteos y la secreción de progesterona, de forma que la retirada del estradiol en conejas gestantes provoca un declive en la secreción de progesterona. Este mecanismo no se conoce totalmente, pero existen evidencias de que esta retirada del estradiol aumenta la concentración de metabolitos oxigenados, eleva los niveles de citoquinas y disminuye el flujo sanguíneo, desencadenando el inicio de la apoptosis o regresión de los cuerpos lúteos (Gadsby *et al.*, 1983; Gadsby y Keyes, 1984; Holt, 1989; Goodman *et al.*, 1998; Boiti *et al.*, 2003 y 2004). En el conejo, la progesterona es secretada exclusivamente por los cuerpos lúteos y sus niveles séricos aumentan desde el día 1 hasta los días 10-12 de gestación, disminuyendo desde este momento hasta el parto, mientras que los de 17β -estradiol, después de la ovulación, se mantienen constantes a lo largo de la gestación (Browning *et al.*, 1980; Gadsby *et al.*, 1983). Los niveles séricos de progesterona a los 12 días de gestación observados en ambas líneas son similares a los obtenidos en estudios previos realizados en otras líneas de conejo (Browning *et al.*, 1980; Gadsby *et al.*, 1983; Gadsby y Keyes, 1984; Dugré *et al.*, 1989; Mocé *et al.*, 2002). Sin embargo, los niveles séricos de progesterona en el día 24 de gestación disminuyen considerablemente en la línea R respecto a la línea A y respecto a otras líneas de conejo (Browning y Wolf, 1981; Gadsby y Keyes, 1984),

probablemente como consecuencia de sus bajos niveles de 17β -estradiol. Si la actividad esteroideogénica en esta línea se ve afectada por el genotipo, el índice de masa corporal o la tasa metabólica sería difícil de entender. Sin embargo, los elevados niveles de IGF-I a 12 días podrían sugerir una alta tasa metabólica o bien, problemas metabólicos que pueden alterar la cantidad o la biodisponibilidad de esteroides. En conejo, los niveles séricos de IGF-I aumentan durante la gestación para soportar la actividad metabólica necesaria para el crecimiento uterino, placentario, fetal y mamario, y desciende en el parto (Hadsell *et al.*, 2002). De acuerdo con esto, las hembras lactantes presentaron niveles superiores que las no lactantes, por el menor esfuerzo metabólico de estas últimas en el día 12 de gestación. Estos elevados niveles de IGF-I no parecen tener una ventaja reproductiva en la línea R y podrían indicar problemas metabólicos que afectarían a la función reproductiva. Los elevados niveles de IGF-I encontrados en líneas seleccionadas por velocidad de crecimiento parecer ser inherentes en estas líneas y tienen un efecto favorable en el peso al nacimiento y el crecimiento post-natal (Clutter *et al.*, 1995). El IGF-I parece tener un efecto inhibitorio de la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa, que controla la producción de óxido nítrico, molécula señalizadora que regula el metabolismo energético con implicaciones patológicas y nutricionales (Castrillo *et al.*, 2000; Jobgen *et al.*, 2006). En ratones transgénicos, una delección de la óxido nítrico sintasa tipo III causa una reducción de la tasa metabólica, lo que conlleva una mayor eficiencia alimentaria y una ganancia de peso (Nisoli *et al.*, 2003). De esta forma, el mayor tamaño de los gazapos como consecuencia de un menor tamaño de camada y/o de hembras de mayor peso con elevados niveles de IGF-I podría ser responsable de las mayores pérdidas perinatales debido a la distocia observada en la línea R. Además, el óxido nítrico y la enzima óxido nítrico sintasa se han relacionado tanto con el proceso de ovulación como con la actividad esteroideogénica del cuerpo lúteo en conejo (Yamauchi *et al.*, 1997; Boiti *et al.*, 2003). La línea R podría ser un buen modelo animal para el estudio de la relación entre la reproducción, el balance energético y la eficiencia alimentaria en futuros estudios.

Por otro lado, los resultados del actual experimento no muestran efecto de la lactación en la inducción de la ovulación ni en las tasas de ovulación e implantación, pérdidas fetales o gestacionales, de acuerdo con otros autores (Fortun-Lamothe y Lebas, 1994; Fortun-Lamothe y Bolet, 1995; Fortun-Lamothe y Prunier, 1999). Las diferencias observadas en el número de embriones implantados a los 12 días no fueron relevantes cuando se relacionaron las pérdidas implantacionales con la tasa de ovulación. Sin embargo, las hembras lactantes presentaron pérdidas perinatales superiores a las de las hembras no lactantes, pero este efecto negativo no puede explicarse por las diferencias en los niveles séricos de los esteroides estudiados. Al contrario de los estudios realizados por Fortun-Lamothe *et al.* (1993), Fortun-Lamothe y Bolet (1995) y Mocé *et al.* (2002), no se han observado diferencias en los niveles de progesterona entre hembras lactantes y no lactantes y, en consonancia con esto, tampoco existen diferencias en los niveles séricos de 17β -estradiol. Las diferencias entre los distintos estudios podrían ser debidas a las distintas líneas utilizadas (tamaño de camada, producción de leche,...) o diferencias en la alimentación o el manejo. Fortun-Lamothe *et al.* (1999) observaron una correlación negativa entre la prolactina y la progesterona, y propusieron que la elevada mortalidad fetal en hembras lactantes dependía más del nivel hormonal basal asociado a la lactación que del balance energético de la hembra.

Los elevados niveles de IGF-I en las hembras lactantes pueden estar relacionados con la elevada tasa metabólica resultado de la superposición de lactación y gestación, efecto observado previamente por Xiccato *et al.* (2005). El balance energético podría estar comprometido en hembras lactantes y afectar de forma negativa al desarrollo fetal y al peso al nacimiento, aumentando la mortalidad en el parto. Dado que el IGF-I interviene en la tasa de crecimiento, nutrición, reproducción y longevidad, debería tenerse en cuenta en futuros estudios con líneas seleccionadas de conejo.

Como conclusión, las hembras de la línea R, seleccionada por velocidad de crecimiento, presentan importantes deficiencias reproductivas, como una baja respuesta a la inducción de la ovulación, tasa de implantación a los 12 días y elevadas

pérdidas fetales y perinatales. Estas deficiencias podrían ser explicadas por las diferencias en los niveles de 17β -estradiol y su posible efecto en la disminución de los niveles séricos de progesterona a los 24 días de gestación. Por tanto, son necesarios futuros estudios sobre la producción y biodisponibilidad esteroidea y la relación de éstas con la actividad metabólica en esta línea. Las hembras de esta línea presentan, además, unos elevados niveles de IGF-I a los 12 días de gestación respecto a la línea A y similar a los encontrados en las hembras lactantes, lo que podría indicar diferencias en el balance energético y hace necesarios más estudios relacionando la reproducción y la tasa metabólica.

3.1.6. Bibliografía

Adams CE, 1960. Prenatal mortality in the rabbit *Oryctolagus cuniculus*. J Reprod Fertil 1, 36-44.

Arias-Álvarez M, García-García RM, Rebollar PG, Nicodemus N, Revuelta L, Millán P, Lorenzo PL, 2009. Effects of a lignin-rich fibre diet on productive, reproductive and endocrine parameters in nulliparous rabbit does. Livest Sci 123, 107-115.

Argente MJ, Santacreu MA, Climent A, Blasco A, 2003. Relationship between uterine and fetal traits in rabbits selected on uterine capacity. J Anim Sci 81, 1265-1273.

Argente MJ, Santacreu MA, Climent A, Blasco A, 2008. Effect on intrauterine crowding on available uterine space per fetus in rabbits. Livest Sci 114, 211-219.

Bazer FW, Terqui M, Martinat-Botte F, 1990. Physiological limits to reproduction. Proceedings of the 4th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Edinburgh (UK) 16, 292-298.

Bergeron D, Audette M, Lambert RD, 1996. Regulation of leukocyte interleukin 2 and interleukin 2 receptor gene expression by rabbit blastocoelic fluid. J Reprod Fertil 106, 143-151.

Blasco A, Bidanel JP, Bolet G, Haley C, Santacreu MA, 1993. The genetics of prenatal survival of pigs and rabbits: a review. Livest Prod Sci 37, 1-21.

Blasco A, Argente MJ, Haley CS, Santacreu MA, 1994. Relationship between

component of litter size in unilaterally ovariectomized and intact rabbit does. *J Anim Sci* 72, 3066-3072.

Boiti C, Guelfi G, Zampini D, Brecchia G, Gobetti A, Zerani M, 2003. Regulation of nitric oxide synthase isoforms and role of nitric oxide during prostaglandin F₂α-induced luteolysis in rabbits. *Reproduction* 125, 807-816.

Boiti C, Guelfi G, Zerani M, Zampini D, Brecchia G, Gobetti A, 2004. Expression patterns of cytokines, p53, and nitric-oxide synthase isoenzymes in corpora lutea of pseudopregnant rabbits during spontaneous luteolysis. *Reproduction* 127, 229-238.

Bolet G, Theau-Clément M, 1994. Fertilisation rate and preimplantation embryonic development in two rabbit strains of different fecundity, in purebreeding and crossbreeding. *Anim Reprod Sci* 36, 153-162.

Brecchia G, Bonanno A, Galeati G, Federici C, Maranesi M, Godetti A, Gerani M, Boiti C, 2005. Hormonal and metabolic adaptation to fasting: effects on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and reproductive performance on rabbit does. *Dom Anim Endocrinol* 31, 105-122.

Brien FD, 1986. A review of the genetic and physiological relationship between growth and reproduction in mammals. *Anim Breed Abstr* 54, 975-997.

Browning JY, Keyes PL, Wolf RC, 1980. Comparison of serum progesterone, 20 α-dihydroprogesterone, and estradiol-17 β in pregnant and pseudopregnant rabbits: evidence for postimplantation recognition of pregnancy. *Biol Reprod* 23, 1014-1019.

Browning JY, Wolf RD, 1981. Maternal recognition of pregnancy in the rabbit: effect of conceptus removal. *Biol Reprod* 24, 293-297.

Bünger L, Lewis RM, Rothschild MF, Blasco A, Renne U, Simm G, 2005. Relationships between quantitative and reproductive fitness traits in animals. *Phil Trans R Soc B* 360, 1489-1502.

Camacho J, Baselga M, 1990. Estimation des corrélations génétiques entre caractères de reproduction et de croissance à travers la réponse à la sélection. *Proceedings of the 5èmes Journées de la Recherche Cunicule, Paris (France) ITAVI* 2, 1-9.

Cappon GD, Fleeman TL, Chapin RE, Hurtt ME, 2005. Effects of feed restriction during organogenesis on embryo-fetal development in rabbit. *Birth Defects Res B Dev Reprod*

Toxicol 74, 424-430.

Castrillo A, Bodelón OG, Boscá L, 2000. Inhibitory effect of IGF-I on type 2 nitric oxide synthase expression in Ins-1 cells and protection against activation-dependent apoptosis. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase. *Diabetes* 49, 209-217.

Cifre J, Vicente JS, Baselga M, García-Ximénez F, 1994. Ovulation rate in lines of rabbits selected on different criteria. *Cahiers Options Méditerranéennes* 8, 247-252.

Clutter AC, Spicer LJ, Woltmann MD, Grimes RW, Hammond JM, Buchanan DS, 1995. Plasma growth hormone, insulin-like growth factor I, and insulin-like growth factor binding proteins in pigs with divergent genetic merit for postweaning average daily gain. *J Anim Sci* 73, 1776-1783.

Crossey PA, Pillai CC, Miell JP, 2002. Altered placental development and intrauterine growth restriction in IGF binding protein-1 transgenic mice. *J Clin Invest* 10, 411-418.

Dugré FJ, Lambert RD, Bélanger A, Fortier Ma, Caron S, 1989. Local effect of the rabbit embryo-foetus on uterine progesterone and pregnenolone levels. *Mol Cel Endocrinol* 64, 251-255.

Estany J, Baselga M, Blasco A, Camacho J, 1989. Mixed model methodology for the estimation of genetic response to selection in litter size of rabbit. *Livest Prod Sci* 21, 67-76.

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.

Fortun L, Lebas F, 1994. Influence of the number of suckling young and the feed level on foetal survival and growth in rabbit does. *Ann Zootech* 43, 163-171.

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.

Fortun-Lamothe L, Bolet G, 1995. Les effects de la lactation sur les performances de reproduction chez la lapine. *INRA Prod Anim* 8, 49-56.

Fortun-Lamothe L, Prunier A, 1999. Effects on lactation, energetic déficit and remating intervalo on reproductive performance of primiparous rabbit does. *Anim Reprod Sci* 55, 289-298.

Fortun-Lamothe L, Prunier A, Bolet G, Lebas F, 1999. Physiological mechanisms

involved in the effects of concurrent pregnancy and lactation on foetal growth and survival in the rabbit. *Livest Prod Sci* 60, 229-241.

Fortun-Lamothe L, 2006. Energy balance and reproductive performance in rabbit does. *Anim Reprod Sci* 93, 1-15.

Foxcroft GR, Dixon WT, Novak S, Putman CT, Town SC, Vinsky MDA, 2006. The biological basis for prenatal programming of postnatal performance in pigs. *J Anim Sci* 84, 105-112.

Freking BA, Leymaster KA, Vallet JL, Christenson RK, 2007. Number of fetuses and conceptus growth throughout gestation in lines of pigs selected for ovulation rate or uterine capacity. *J Anim Sci* 85, 2093-2103.

Gadsby JE, Keyes PL, Bill CH, 1983. Control of corpus luteum function in the pregnant rabbit: role of estrogen and lack of a direct luteotropic role of the placenta. *Endocrinology* 113, 2255-2262.

Gadsby JE, Keyes L, 1984. Control of corpus luteum function in the pregnant rabbit: role of the placenta ('Placental Luteotropin') in regulating responsiveness of corpora lutea to estrogen. *Biol Reprod* 31, 16-24.

García ML, Baselga M, 2002. Estimation of correlated response on growth traits to selection in litter size of rabbits using a cryopreserved control population and genetic trends. *Livest Prod* 78, 91-98.

Garreau H, Szendro ZS, Larzul C, Rochambeau de H, 2000. Genetic parameters and genetic trends of growth and litter size traits in the White Pannon breed. *Proceedings of the 7th World Rabbit Congress, Valencia (Spain)* 403-408.

Goodman SB, Kugu K, Chen SH, Preutthipan S, Tilly KI, Tilly JL, Dharmarajan AM, 1998. Estradiol-mediated suppression of apoptosis in the rabbit corpus luteum is associated with a shift in expression of bcl-2 family members favoring cellular survival. *Biol Reprod* 59, 820-827.

Gómez EA, Rafel O, Ramon J, 1998. Genetic relationship between growth and litter size traits at first parity in a specialized dam line. *Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Amidale (Australia)* 552-555.

Gómez EA, Baselga M, Rafel O, García ML, Ramón J, 1999. Selection, diffusion and

performances of six Spanish lines of meat rabbit. *Cahiers Options Méditerranéennes* 41, 147-152.

Hadsell DL, Bonnette SG, Lee AV, 2002. Genetic manipulation of the IGF-I axis to regulated mammary gland development and function. *J Dairy Sci* 85, 365-377.

Hafez ESE, Ishibashi I, 1965. Effect of lactation and age at first breeding on size and survival of rabbit blastocyst. *Int J Fertil* 10, 47-55.

Hafez ESE, Tsutsumi Y, 1966. Changes in endometrial vascularity during implantation and pregnancy in the rabbit. *Am J Anat* 118, 249-282.

Hoffman LH, Olson DD, Carson DD, Chilton BS, 1998. Progesterone and implanting blastocyst regulate Muc-1 expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinology* 139, 266-271.

Holt JA, 1989. Regulation of progesterone production in the rabbit corpus luteum. *Biol Reprod* 40, 201-208.

Holt M, Vanger O, Farstad W, 2004. Components of litter size in mice after 110 generations of selection. *Reproduction* 127, 587-592.

Jobgen WS, Fried SK, Fu WJ, Meininger CJ, Wu G, 2006. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism energy substrates. *J Nutr Biochem* 17, 571-588.

Mehaisen GMK, 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.

Mgheni M, Christensen K, 1985. Selection experiment on growth and litter size in rabbits. II. Two-way selection response for body weight at 112 days. *Acta Agric Scand* 35, 278-286.

Mocé ML, Santacreu MA, Climent A, 2002. Effect of divergent selection for uterine capacity on progesterone, estradiol and cholesterol levels around implantation time in rabbit. *World Rabbit Sci* 10, 89-97.

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.

- Nisoli E, Clementi E, Paolucci CE, Cozzil V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO, 2003. Mitochondrial biogenesis in mammals. The role of endogenous nitric oxide. *Science* 5608, 896-899.
- Pandian AMC, Lambert RD, Roy R, 1988. Immunosuppressive effects of rabbit blastocoelic fluid and embryo culture medium. *J Reprod Immunol* 13, 221-234.
- Peiró R, Santacreu MA, Climent A, Blasco A, 2007. Early embryonic survival and embryo development in two lines of rabbits divergently selected for uterine capacity. *J Anim Sci* 85, 1634-1639.
- Pope WF, Xie S, Broermann DM, Nephew KP, 1990. Causes and consequences of early embryonic diversity in pigs. *J Reprod Suppl* 40, 251-260.
- Rabad M, Baselga M, 2010. Inbreeding effect on reproductive traits in four maternal lines of rabbits. Proceedings of the 9th World Congress on Genetic Applied to Livestock Production, Leipzig (Germany) ID083.
- Rochambeau de H, Bolet G, Tudela F, 1994. Long term selection. Comparison of two rabbit strains. Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Guelph (Canadá) 257-260.
- Santacreu MA, Climent A, Gallego M, Fayos L, Blasco A, 1996. Fertilization rate and early embryo development in two rabbit lines selected for uterine efficiency. Proceedings of the 6th World Rabbit Congress, Toulouse (France) 2, 355-357.
- Santacreu MA, Mocé ML, Climent A, Blasco A, 2005. Divergent selection for uterine capacity in rabbits. II. Correlated response in litter size and its components estimated with a cryopreserved control population. *J Anim Sci* 83, 2303-2307.
- Seshagiri PB, Sen Roy S, Sireesha G, Rao RP, 2009. Cellular and molecular regulation of mammalian blastocyst hatching. *J Reprod Immunol* 83, 79-84.
- Spencer TE, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW, 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci* 82-83, 537-550.
- Tao T, Niemann H, 2000. Cellular characterization of blastocysts derived from rabbit 4-, 8- and 16-cell embryos and isolated blastomeres cultured in vitro. *Hum Reprod* 15, 881-889.
- Vicente JS, Viudes-de-Castro MP, García ML, Baselga M, 2003. Effect of rabbit line on a

- cryopreservation program by vitrification. *Reprod Nut Develop* 43, 147-153.
- Viudes-de-Castro MP, García-Ximénez F, Vicente JS, 1995. Embryo recovery from eliminating does of three rabbit strain for an embryo bank. *Invest Agr Prod Sanid Anim* 10, 145-152.
- Wilmut I, Sales DI, Ashworth E, 1986. Maternal and embryonic factors associated with prenatal loss in mammals. *J Reprod Fert* 76, 851-864.
- Wolfenson D, Blum O, 1988. Embryonic development, conception rate, ovarian function and structure in pregnant rabbits heat-stressed before or during implantation. *Anim Reprod Sci* 17, 259-270.
- Xiccato G, Trocino A, Boiti C, Brecchia G, 2005. Reproductive rhythm and litter weaning age as they affect rabbit doe performance and body energy balance. *Anim Sci* 81, 289-296.
- Yamauchi J, Miyazaki T, Iwasaki S, Kishi I, Kuroshima M, Tei C, Yoshimura Y, 1997. Effects of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prostaglandin production in the rabbit. *Endocrinology* 138, 3630-3637.
- Yoshinaga K, 1988. Uterine receptivity for blastocyst implantation. *Ann NY Acad Sci* 541, 424-431.

Experimento 3.2

3.2. Efecto del genotipo embrionario y materno sobre la supervivencia embrionaria y fetal

3.2.1. Resumen

En el experimento anterior de esta tesis, se ha demostrado que las hembras de la línea R presentan diferencias reproductivas respecto a la línea A. En concreto, pese a que las tasas de ovulación son similares en ambas líneas, la línea R presenta unas pérdidas gestacionales muy superiores, llegando éstas hasta casi un 50% en total. Con el fin de analizar la influencia de los genotipos embrionario y materno en estas pérdidas, se han realizado transferencias recíprocas de 174 embriones de cada una de las líneas en un total de 29 hembras adultas. Los resultados muestran que, además de presentar unas tasas de ovulación similares, la tasa de recuperación embrionaria a 48 horas, tasa de fecundidad y tasa de desarrollo embrionario a 48 horas son similares en ambas líneas. Sin embargo, existen diferencias en la supervivencia embrionaria (hasta los 14 días de gestación) que dependen tanto del genotipo materno como del embrionario. De esta forma, las hembras (efecto genotipo materno) de la línea R y los embriones (efecto genotipo embrionario) de la línea A presentan el mayor número de embriones implantados. Por su parte, la supervivencia fetal (hasta los 25 días de gestación) también muestra diferencias significativas debidas, en este caso, únicamente al genotipo del embrión, siendo superior para embriones de la línea A, utilizando cualquiera de las dos líneas como receptora (número de fetos vivos a 25 días de gestación $0,65 \pm 0,036$ para los embriones de la línea R en cualquiera de las líneas como receptora). No existen diferencias en los pesos de placentas maternas ni en el peso de la grasa perirrenal de las hembras receptoras. Sin embargo, tanto el genotipo materno como el embrionario tienen efecto en los pesos de las placentas fetales, que son superiores tanto para hembras como para embriones de la línea R ($3,73 \pm 0,065$ y $3,73 \pm 0,064$ g, respectivamente), y únicamente el genotipo embrionario tiene efecto en el peso fetal, siendo éste superior para los fetos de la línea R. Por último, el análisis de la ganancia de peso de las hembras entre el día 14 y el día 25 de gestación fue

superior en hembras de la línea A, siendo del 42%, respecto al 6% en las hembras de la línea R.

3.2.2. Introducción

El efecto de la línea genética en las características reproductivas se ha estudiado en diferentes especies de mamíferos como ratón, cerdo o conejo. Algunas características como la respuesta a la superovulación en ratón (Ernst *et al.*, 2000), la producción por parte del embrión de factores como estradiol o IGF-I en cerdo (Wilson y Ford, 1997) o las tasas de fecundidad y de ovulación en conejo (Torres *et al.*, 1987; Bolet y Theau-Clément, 1994) dependen de la línea genética utilizada. Peiró *et al.* (2007) demostraron que la selección divergente en conejo influía en el desarrollo y supervivencia embrionaria. Estudios realizados mediante transferencias recíprocas muestran que el genotipo materno y embrionario influye de forma diferente en las supervivencias embrionaria y fetal. De esta forma, pese a que Bradford (1979) y Pomp *et al.* (1989) en ratón, y Kaminski *et al.* (1996) en cerdo, relacionan la supervivencia con el genotipo materno, varios autores sugieren que el genotipo del embrión podría modificar las secreciones uterinas, de forma que las pérdidas prenatales no dependerían exclusivamente de factores maternos en cerdo (Wilson y Ford, 1997) y conejo (Hoffman *et al.*, 1998). También en conejo, Mocé *et al.* (2004) muestran un efecto del genotipo materno tanto en la tasa de implantación como en la supervivencia hasta los 28 días de gestación, aunque también indican que el genotipo embrionario afecta a la supervivencia fetal en un ambiente materno favorable. De la misma forma, otros autores muestran que, aunque con menor efecto, el genotipo embrionario también afecta a la supervivencia embrionaria y fetal. De esta forma, Moler *et al.* (1981) en estudios con una línea de ratón seleccionada por supervivencia embrionaria observaron que, pese a que el genotipo materno presentaba un mayor efecto, el genotipo embrionario también parecía tener influencia en el número de embriones implantados. Otros autores han demostrado que la supervivencia prenatal en ratón no sólo depende del genotipo embrionario, sino que tanto el genotipo materno como la interacción entre ambos influyen en este carácter (Ernst *et al.*, 2000). Sin embargo, Ashworth *et al.* (1990) observaron un efecto del genotipo embrionario en

la supervivencia embrionaria y Youngs *et al.* (1994) han observado este efecto en factores como el tamaño embrionario, contenido de ADN y proteínas, etc., relacionados con la supervivencia embrionaria en cerdo. Este mismo efecto del genotipo embrionario en la supervivencia prenatal también se ha observado en ratón (Moore *et al.*, 1970).

En la bibliografía existen diferentes experimentos realizados con el fin de observar si la influencia de ambos genotipos difiere en el peso de las placentas o bien, en el peso de los fetos, ya que estos caracteres influyen finalmente en la supervivencia y en el tamaño de camada. De esta forma, estudios realizados en cerdo demuestran que, tanto el genotipo materno como el embrionario influyen en el peso de la placenta fetal (Biensen *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998), mientras que en conejo parece que sólo influye el genotipo materno (Mocé *et al.*, 2004). Cuando el carácter estudiado es el peso al nacimiento, diferentes trabajos muestran la importancia tanto del genotipo materno, como del embrionario y de la interacción entre ambos (Al-Murrani y Roberts, 1978; Barkley y Fitzgerald, 1990). Por otro lado, el tamaño de camada depende, exclusivamente, del genotipo materno (Moore *et al.*, 1970; Pomp *et al.*, 1989; Moler *et al.*, 1981).

En este trabajo se ha realizado un experimento de transferencias recíprocas en hembras nulíparas pertenecientes a dos líneas de conejo, A y R, con el fin de analizar la influencia de los genotipos materno y embrionario en las pérdidas gestacionales, así como en el peso de los fetos y de sus placentas maternas y fetales a 25 días de gestación.

3.2.3. Material y métodos

Recuperación de embriones

Como animales donantes de embriones se utilizaron un total de 68 hembras nulíparas contemporáneas a las receptoras (también nulíparas), pertenecientes a las dos líneas genéticas objeto de estudio (33 de la línea A y 35 de la línea R). A cada una de las

hembras se le inyectó 25 U.I. de eCG de forma intramuscular (Intervet International B.V., Bowmeer-Holland) con el fin de inducir la receptividad, inseminándola 48 horas después utilizando una mezcla de eyaculados provenientes de machos de fecundidad probada de la misma línea de selección para aleatorizar el efecto macho. En el momento de la inseminación, a la hembra se le inyectó 1 μg de acetato de buserelina (Hoescht, Marion Roussel, Madrid, España) para inducir la ovulación. Estas hembras se sacrificaron a las 48 horas después de la inseminación y se recogieron y lavaron los tractos reproductivos con 5 ml de tampón fosfato salino Dulbecco (DPBS) a temperatura ambiente. Los embriones recuperados morfológicamente normales se guardaron a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su transferencia en una hembra receptora. Se anotaron el número de cuerpos lúteos (tasa de ovulación) y el número de embriones y óvulos recuperados (tasa de recuperación), además del momento de desarrollo en el que se encontraban estos embriones. De esta forma, pudieron calcularse las tasas de recuperación (número de embriones y óvulos recuperados respecto la tasa de ovulación total observada), de fecundidad (número de embriones recuperados respecto del total recuperado) y de grado de desarrollo de los embriones de cada una de las líneas genéticas utilizadas (diferenciando entre embriones de menos de 16 células, y embriones de más de 16 células o mórulas tempranas).

Transferencia embrionaria

Un total de 348 embriones (174 de cada una de las líneas de selección) fueron transferidos en 29 hembras adultas, nulíparas y contemporáneas de las dos líneas genéticas sometidas a estudio (15 de la línea R y 14 de la línea A). Únicamente, las hembras receptoras (la receptividad fue determinada por el color vulvar) fueron inducidas a ovular mediante una inyección de 1 μg de acetato de buserelina (Hoescht, Marion Roussel, Madrid, España) 48 horas antes de la transferencia. Las hembras fueron anestesiadas mediante una inyección intramuscular de 4 mg/Kg de xilacina (Rompún, Bayer AG, Leverkusen, Alemania), seguida de una inyección intravenosa en

la vena caudal de la oreja de 0,4 ml/ Kg de peso de clorhidrato de ketamina (Imalgène 500, Merial SA, Lin, Francia). Este procedimiento se realizó mediante la técnica de laparoscopia descrita por Besenfelder y Brem (1993). El número de embriones transferidos fue estandarizado a seis por cuerno uterino, de forma que cada hembra receptora recibió un total de 12 embriones (seis de la línea A en uno de sus oviductos y seis de la línea R en el otro) (figura 13).



Figura 13. Fotografía realizada en el momento de la transferencia donde se observa cómo se realiza la transferencia de embriones de 48 horas en el oviducto de la hembra anestesiada.

Laparoscopia de diagnóstico gestacional

Todas las hembras receptoras fueron sometidas a una laparoscopia ventral a los 14 días de gestación. La anestesia fue inducida del mismo modo que para el procedimiento de transferencia explicado anteriormente. Las tasas de ovulación y de implantación fueron obtenidas mediante el recuento de cuerpos lúteos en el ovario y de embriones implantados en el útero.

Variables fetales y maternas

Las hembras receptoras fueron sacrificadas a los 25 días de gestación. En el momento de sacrificio se anotaron el peso de la hembra, el peso de la grasa perirrenal, pesos de

cada uno de los fetos sin placentas ni fluidos y los pesos tanto de la placenta materna como de la fetal de cada uno de ellos (figura 14). Para cada uno de los cuernos uterinos, se clasificaron los fetos recuperados según su estado como fetos vivos, fetos muertos y placentas en regresión (figura 15).

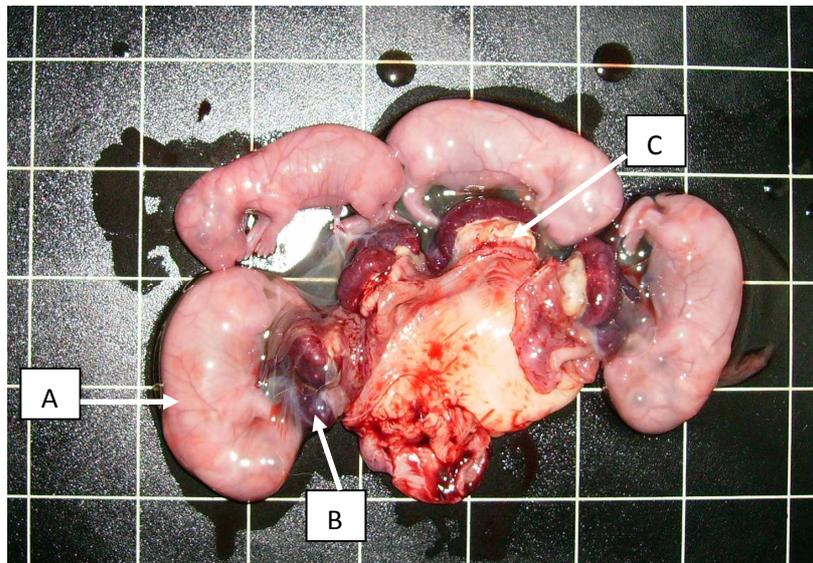


Figura 14. Fotografía donde se muestran cada uno de los fetos (A), placentas fetales (B) y placentas maternas (C) obtenidos en un cuerno uterino.

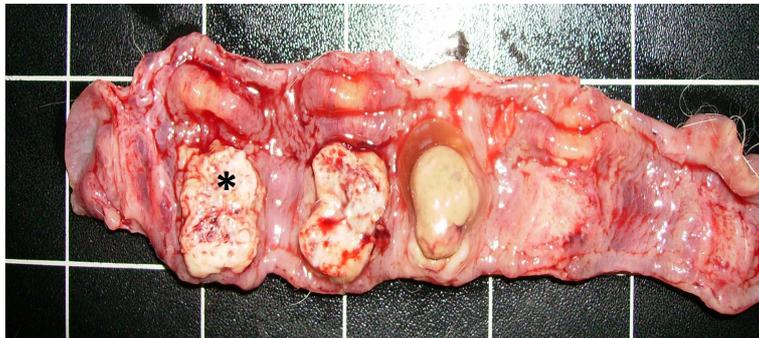


Figura 15. Detalle de placenta materna (*) y placenta y feto en regresión observadas en cuerno uterino.

Análisis estadístico

Tanto las tasas de recuperación, de fecundidad y de grado de desarrollo, como las de ovulación e implantación a 14 días de gestación, además de los diferentes pesos fueron analizados mediante un análisis de la varianza con un modelo lineal generalizado mediante el paquete informático SPSS 16.0 software package (SPSS Inc.,

Chicago, Illinois, USA, 2002), incluyendo como efectos fijos la línea genética de la hembra receptora y la del embrión transferido, así como su interacción, además de incluir en el análisis diferentes covariables (tabla 5). Se consideraron significativas las diferencias que mostraron un p-valor menor de 0,05.

Tabla 5. Variables analizadas (PF: peso de los fetos vivos a 25 días, PPF: peso de la placenta fetal, PPM: peso de la placenta materna, DF: diferencia de peso de la hembra entre el momento de laparoscopia y el de sacrificio) y covariables incluidas en los análisis (PF: peso de los fetos vivos a 25 días, TVF: número total de fetos vivos a 25 días).

		Variables analizadas			
		PF	PPF	PPM	DF
Covariables incluidas	PF		+	+	
	TVF	+	+	+	+
	TVF y PF		+	+	

Por otro lado, la implantación a 14 días y el número de fetos vivos a 25 días de gestación en relación con el número de embriones transferidos, se analizaron mediante una regresión Probit con distribución binomial del error que incluyó los factores línea de la receptora (genotipo materno, R y A) y línea del embrión (genotipo embrionario, R y A), además de la interacción entre ambos, así como la covariable embriones implantados en el modelo de análisis del número de fetos desarrollados a 25 días. Todos los análisis se realizaron con el paquete informático SPSS 16.0 software package (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA, 2002).

3.2.4. Resultados

Respecto a los datos obtenidos en las recuperaciones embrionarias, la tasa de recuperación fue del 91%. Las tasas de ovulación de ambas líneas fueron similares, encontrándose ambas alrededor de 11 folículos con cicatriz de ovulación por hembra. Por su parte, las tasas de fecundidad se situaron en torno al 90,5% para la línea A y al 82,1% para la línea R, no siendo significativa esta diferencia. Por último, al calcular las tasas de desarrollo embrionario tampoco se encontraron diferencias entre las líneas (tabla 6).

Tabla 6. Tasas de ovulación (medida como número de cuerpos lúteos contados en los ovarios), de fecundidad (en porcentaje) y de desarrollo embrionario (porcentaje de embriones de menos de 16 células y mórulas tempranas (>16 células)) obtenidas en las hembras nulíparas donantes de embriones de las dos líneas genéticas estudiadas (medias estimadas \pm error estándar) ($p < 0,05$).

		n	Tasa de Ovulación	Fecundidad (%)	Desarrollo embrionario	
					<16 células (%)	>16 células o Mórulas tempranas (%)
Línea	A	39	11,7 \pm 0,58	90,5 \pm 5,36	39,4 \pm 7,86	57,6 \pm 8,53
	R	35	11,3 \pm 0,53	82,1 \pm 5,21	20,8 \pm 7,63	65,0 \pm 8,28

Cuando analizamos la proporción de embriones implantados a 14 días de gestación, ésta fue diferente dependiendo tanto de la línea de la hembra receptora como de la del embrión, siendo superior el efecto materno en la línea R y el efecto embrionario en la línea A. De esta forma, las hembras de la línea A implantaban $0,64 \pm 0,036$ embriones, mientras que fue de $0,78 \pm 0,033$ en la línea R (tabla 7, datos expresados en tanto por uno). Por su parte, los embriones que provenían de la línea A presentaron una tasa de implantación de $0,78 \pm 0,032$, mientras que fue de $0,65 \pm 0,033$ en la línea R (tabla 7).

Tabla 7. Tasas de implantación a 14 días para las líneas A y R como receptoras y como donantes. En la tabla se muestran las medias estimadas \pm error estándar. ^{a,b} valores en la misma columna o línea y factor con diferente superíndice son estadísticamente diferentes (p -valor $< 0,05$)

Tasa de implantación a 14 días		Línea donante		Efecto genotipo materno
		A	R	
Línea receptora	A	0,68 \pm 0,049	0,61 \pm 0,051	0,64 \pm 0,036 ^b
	R	0,86 \pm 0,038	0,69 \pm 0,050	0,78 \pm 0,033 ^a
Efecto genotipo embrionario		0,78 \pm 0,032 ^a	0,65 \pm 0,033 ^b	

Por otro lado, al analizar la proporción de fetos observado en el sacrificio (a los 25 días de gestación), se observó un efecto de la línea genética del embrión, siendo el número de fetos a 25 días para la línea A superior al de la línea R ($0,65 \pm 0,036$ versus $0,53 \pm 0,038$, respectivamente. Tabla 8, datos expresados en tanto por uno). El coeficiente de la covariable número de fetos implantados fue $0,019 \pm 0,0219$ ($p > 0,05$).

Tabla 8. Número de fetos vivos a 25 días para las líneas A y R como receptoras y como donantes. En la tabla se muestran las medias estimadas \pm error estándar. ^{a,b} valores en la misma columna o línea y factor con diferente superíndice son estadísticamente diferentes (p -valor $<0,05$).

Número de fetos vivos a 25 días	Línea donante		Efecto genotipo materno	
	A	R		
Línea receptora	A	$0,59 \pm 0,052$	$0,53 \pm 0,053$	$0,56 \pm 0,037$
	R	$0,70 \pm 0,050$	$0,52 \pm 0,054$	$0,62 \pm 0,038$
Efecto genotipo embrionario		$0,65 \pm 0,036^a$	$0,53 \pm 0,038^b$	

Respecto al análisis de los pesos de los fetos y de las placentas fetales y maternas en el momento del sacrificio (25 días de gestación), tanto el peso fetal como el peso de la placenta fetal mostraron diferencias significativas. El peso del feto a 25 días de gestación es afectado por el genotipo embrionario, siendo mayor el peso de los fetos de la línea R independientemente de incluir como covariable el número total de fetos vivos a 25 días (tabla 9, coeficiente de la covariable \pm error típico: $-0,172 \pm 0,134$, $p > 0,05$). Por su parte, el peso de la placenta fetal dependía tanto del genotipo materno como del embrionario, siendo mayor en ambos casos para la línea R independientemente de incluir las covariables número total de fetos vivos a 25 días y peso fetal. Los coeficientes de ambas covariables fueron, respectivamente, $-0,125 \pm 0,025$ ($p < 0,05$) y $0,111 \pm 0,011$ ($p < 0,05$), cuando se incluían en el análisis de forma independiente y $-0,106 \pm 0,020$ ($p < 0,05$) para el número de fetos vivos a 25 días y $0,106 \pm 0,011$ ($p < 0,05$) para el peso fetal, cuando ambas fueron incluidas en el análisis simultáneamente. En cuanto al peso de la placenta materna, no hubo diferencias

significativas (tabla 9). Los coeficientes de las covariables incluidas en el análisis fueron $0,021 \pm 0,015$ ($p > 0,05$) para el número total de fetos vivos y $0,015 \pm 0,008$ para el peso fetal. Cuando se incluían ambas covariables simultáneamente en el análisis, sus coeficientes fueron $0,23 \pm 0,015$ y $0,016 \pm 0,008$ para el número de fetos vivos y el peso fetal, respectivamente, siendo únicamente esta última significativa. La interacción no fue significativa en ninguno de los análisis realizados.

Tabla 9. Pesos de los fetos vivos a 25 días (PF), de las placentas fetales (PPF) y de las placentas maternas (PPM) sin covariable, o bien, utilizando como covariable el número total de fetos vivos a 25 días (subíndice TFV), el peso fetal (subíndice PF) o ambos (subíndice TFV-PF), para las líneas A y R como receptoras y como donantes. En la tabla se muestran las medias estimadas \pm error estándar (gramos). ^{a, b} valores en la misma línea y factor con diferente superíndice son estadísticamente diferentes. Covariables estadísticamente significativos están señalados con asterisco (p -valor $<0,05$).

	Línea			
	Receptora		Embrión	
	A	R	A	R
PF	19,46 \pm 0,405	18,88 \pm 0,404	18,64 \pm 0,382 ^b	19,70 \pm 0,426 ^a
PF_{TFV}	19,32 \pm 0,417	19,03 \pm 0,417	18,60 \pm 0,383 ^b	19,75 \pm 0,427 ^a
PPF	3,52 \pm 0,079 ^b	3,63 \pm 0,079 ^a	3,38 \pm 0,075 ^b	3,77 \pm 0,083 ^a
PPF_{TFV*}	3,42 \pm 0,077 ^b	3,72 \pm 0,077 ^a	3,35 \pm 0,071 ^b	3,80 \pm 0,079 ^a
PPF_{PF*}	3,48 \pm 0,065 ^b	3,65 \pm 0,065 ^a	3,43 \pm 0,062 ^b	3,70 \pm 0,069 ^a
PPF_{TFV*-PF*}	3,40 \pm 0,064 ^a	3,73 \pm 0,064 ^b	3,40 \pm 0,058 ^b	3,73 \pm 0,065 ^a
PPM	1,45 \pm 0,046	1,56 \pm 0,046	1,47 \pm 0,044	1,54 \pm 0,049
PPM_{TFV}	1,46 \pm 0,048	1,54 \pm 0,048	1,47 \pm 0,044	1,54 \pm 0,049
PPM_{PF}	1,44 \pm 0,046	1,56 \pm 0,046	1,47 \pm 0,044	1,53 \pm 0,049
PPM_{TFV-PF*}	1,46 \pm 0,047	1,55 \pm 0,047	1,48 \pm 0,044	1,53 \pm 0,049

Finalmente, se analizó el peso de la hembra en el momento de la laparoscopia (14 días de gestación), así como el peso ganado por la hembra desde el momento de la

laparoscopia hasta el sacrificio (25 días) y el porcentaje de grasa perirrenal que presentaba la hembra respecto de su peso total en el momento del sacrificio. Como se muestra en la tabla 10, el peso a los 14 días de gestación fue superior en hembras de la línea R, mientras que el incremento de peso hasta los 25 días de gestación fue superior en hembras de la línea A cuando se incluía la covariable número de fetos vivos (coeficiente $0,021 \pm 0,017$, $p > 0,05$). Por otra parte, ambas líneas presentaron un porcentaje de grasa perirrenal similar a 25 días de gestación.

Tabla 10. Pesos de las hembras receptoras a 14 días (PC), diferencia entre pesos a 14 y 25 días sin covariable (DP) o bien, utilizando como covariable el número total de fetos vivos a 25 días (subíndice TFV) y el coeficiente de grasa perirrenal respecto al peso total de las mismas (GR) para las líneas A y R. En la tabla se muestran las medias estimadas \pm error estándar. ^{a, b} valores en la misma columna y factor con diferente superíndice son estadísticamente diferentes (p -valor $<0,05$).

		PC (g)	DP (g)	DP _{TFV} (g)	GR (%)
Línea	A	4,10 \pm 0,115 ^a	0,38 \pm 0,405	0,42 \pm 0,235 ^a	2,40 \pm 0,200
	R	5,22 \pm 0,120 ^b	0,08 \pm 0,405	0,06 \pm 0,209 ^b	2,50 \pm 0,200

3.2.5. Discusión

Los estudios de transferencias recíprocas se han utilizado en diversas especies de mamíferos, como en ratón (Al-Murrani y Roberts, 1978; Bradford, 1979; Pomp *et al.*, 1989), cerdo (Ashworth *et al.*, 1990; Youngs *et al.*, 1994; Biensen *et al.*, 1998) o conejo (Mocé *et al.*, 2004), con el fin de conocer los efectos materno y embrionario en la supervivencia embrionaria, con resultados controvertidos. En este trabajo se han realizado transferencias recíprocas aprovechando la independencia de los cuernos uterinos en conejo de modo que la hembra receptora siempre recibía embriones pertenecientes a su línea en uno de sus oviductos y el mismo número de embriones de la otra línea en el oviducto opuesto.

Al igual que en el experimento anterior, las tasas de ovulación para ambas líneas fueron similares, aunque algo menores a las obtenidas anteriormente, probablemente

debido a la utilización de hembras nulíparas en este experimento. Respecto a la tasa de recuperación embrionaria, los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos por otros autores (80% según Mocé *et al.*, 2004; 96% según Peiró *et al.*, 2007). A pesar de que la tasa de fecundidad no fue estadísticamente diferente para ambas líneas, la línea R muestra ya a 48 horas post-inseminación un 82% de embriones en desarrollo, hecho que observaron Mehaisen *et al.* (2005) a las 72 horas post-inseminación, quienes observaron un porcentaje de mórulas catalogadas como normales de alrededor del 76,3%, inferior al de otra línea maternal evaluada en ese mismo estudio (línea V).

Al analizar el efecto materno y embrionario en las tasas de implantación a los 14 días de desarrollo, se observó que tanto el genotipo materno como el embrionario influían en la supervivencia embrionaria en este momento de la gestación, siendo superior para hembras de la línea R (efecto genotipo materno) y para embriones de la línea A (efecto genotipo embrionario). Acorde a estos resultados y con un estudio similar en ratón, Barkley y Fitzgerald (1990) mostraron un efecto tanto del genotipo embrionario como del materno en la supervivencia embrionaria de dos líneas seleccionadas por crecimiento y por tamaño de camada, respectivamente. De acuerdo con estos resultados, la supervivencia embrionaria depende tanto del genotipo embrionario como del materno. Otros autores muestran resultados similares en ratón (Ernst *et al.*, 2000) y en cerdo (Kaminski *et al.*, 1996), de forma que los genotipos embrionario y materno afectan tanto a la supervivencia embrionaria como al desarrollo de estos embriones.

Sin embargo, los resultados obtenidos a este respecto son contradictorios en la bibliografía, ya que Youngs *et al.* (1994) observan únicamente un efecto del genotipo embrionario en ratón, indicando que este genotipo podía afectar a características del propio embrión, como su tamaño y su contenido en ADN y proteínas, factores relacionados con su supervivencia. Ashworth *et al.* (1990) encontraron resultados

similares en cerdo, de forma que la supervivencia embrionaria dependía exclusivamente del genotipo embrionario.

Respecto a la supervivencia fetal, los resultados de este experimento muestran un efecto del genotipo embrionario, de forma que el número de fetos vivos a 25 días fue superior para embriones de la línea A (65% respecto al 53% para la línea R). Estos resultados contradicen lo observado por Mocé *et al.* (2004), donde la supervivencia fetal dependía exclusivamente del genotipo materno. Estos mismos autores indican que el genotipo embrionario influye en la supervivencia fetal únicamente cuando existe un ambiente materno favorable. De la misma forma, observaron un efecto del genotipo embrionario en el peso de la placenta fetal y un efecto materno en el peso fetal, al contrario de lo observado en este experimento, donde tanto el genotipo embrionario como el materno presentaron efecto en el peso fetal y en el de la placenta fetal, siendo superior en ambos casos para la línea R. Resultados similares ya habían sido observados por otros autores en cerdo (Biensen *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998). El peso de la placenta fetal es interesante dado que Bruce y Abdul-Karim (1973) relacionaron el peso de la placenta fetal con el desarrollo embrionario y con el peso fetal, por lo que afecta a la supervivencia en cualquier momento de la gestación (Beck, 1976; Mocé *et al.*, 2004).

Dado que una de las líneas utilizadas en este experimento ha sido seleccionada por velocidad de crecimiento (ganancia de peso en el período de cebo, línea R), es interesante señalar que diferentes trabajos en cerdo relacionan la selección por velocidad de crecimiento con un incremento en la concentración de IGF-I (Te Pas *et al.*, 2001 y 2004). De hecho, en la línea R se han encontrado niveles séricos superiores de IGF-I a los 12 días de gestación respecto a la línea A como muestran los resultados del experimento anterior. Morel *et al.* (1994), utilizando una línea de ratón seleccionada por niveles séricos de IGF-I, observaron que tanto el genotipo embrionario como el materno afectaban al crecimiento fetal y, por tanto, a la supervivencia. Por otro lado, Wilson y Ford (1997) demostraron que la cantidad de estradiol que produce el embrión está correlacionado positivamente con un aumento de las secreciones

uterinas, entre las que se encuentra el factor de crecimiento IGF-I, que afecta directamente al desarrollo embrionario (Lewis *et al.*, 1992). Según los resultados obtenidos, parece que el genotipo embrionario afecta de forma fundamental a la supervivencia a lo largo de toda la gestación, dado que influye tanto en la tasa de implantación, como en el número de fetos vivos a 25 días, en el peso de éstos y en el peso de la placenta fetal.

Respecto a la ganancia de peso de las hembras a lo largo de la gestación, se observó una mayor ganancia de peso entre el día 14 y el día 25 de gestación en las hembras de la línea A respecto a las de la línea R, incluyendo en el análisis el número de fetos vivos como covariable, probablemente debido a que las hembras de la línea R presentan unos pesos superiores a las de la línea A en el momento de la laparoscopia (a 14 días de gestación). Sin embargo, el porcentaje de grasa perirrenal fue similar entre ambas líneas, por lo que este mayor peso en las hembras de la línea R probablemente sea debido a un mayor formato de la línea R en origen, y no a un engrasamiento durante la gestación.

En conclusión, la supervivencia embrionaria (como número de fetos implantados a 14 días de gestación), así como el peso de la placenta fetal a 25 días dependen tanto del genotipo embrionario como del materno, mientras que la supervivencia fetal (como número de fetos vivos a 25 días de gestación) y el peso fetal es afectado por el genotipo embrionario. Por tanto, mientras que las pérdidas hasta los 14 días de gestación y la formación de la placenta fetal dependen de ambos genotipos, la supervivencia fetal y el peso del feto, relacionado con esta supervivencia, son afectados por el genotipo embrionario.

3.2.6. Bibliografía

Al-Murrani WK, Roberts C, 1978. Maternal effects on body weight in mice selected for large and small size. *Genet Res Camb* 32, 295-302.

Ashworth CJ, Haley CS, Aitken RP, Wilmut I, 1990. Embryo survival and conceptus growth after reciprocal embryo transfer between Chinese Meishan and Landrace x Large White gilts. *J Reprod Fertil* 90, 595-603.

Barkley MS, FitzGerald R, 1990. Influence of embryonic and maternal genotype on gestational events in the mouse. *J Reprod Fertil* 89, 285-291.

Beck F, 1976. Comparative placental morphology and function. *Envir Health Persp* 18, 5-12.

Besenfelder U, Brem G, 1993. Laparoscopic embryo transfer in rabbits. *J Reprod Fertil* 99, 53-56.

Biensen NJ, Wilson ME, Ford SP, 1998. The impact of either a Meishan or Yorkshire uterus on Meishan or Yorkshire fetal and placental development to days 70, 90 and 110 of gestation. *J Anim Sci* 76, 2169-2176.

Bolet G, Theau-Clément M, 1994. Fertilization rate and preimplantation embryonic development in two rabbit strains of different fecundity, in purebreeding and crossbreeding. *Anim Reprod Sci* 36, 153-162.

Bradford GE, 1979. Genetic variation in prenatal survival and litter size. *J Anim Sci* 49, 66-74.

Bruce NW, Abdul-Karim RW, 1973. Relationships between fetal weight, placental weight and maternal placental circulation in the rabbit at different stages of gestation. *J Reprod Fertil* 32, 15-24.

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 Reprod Fertil* 118, 205-210.

Hoffman LH, Olson GE, Carson DD, Chilton BS, 1998. P4 and implanting blastocysts regulate Muc-1 expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinology* 139, 266-271.

Kaminski Ma, Ford SP, Youngs CR, Conley AJ, 1996. Lack of effect of sex on pig embryonic development in vivo. *J Reprod Fertil* 106, 107-110.

Lewis Am, Kaye PL, Lising R, Cameron RDA, 1992. Stimulation of protein synthesis and expansion of pig blastocysts by insuline in vitro. *Reprod Fertil Dev* 4, 119-123.

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.

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.

Moler TL, Donahue SE, Anderson GB, Bradford GE, 1981. Effects of maternal and embryonic genotype on prenatal survival in two selected mouse lines. *J Anim Sci* 51, 300-303.

Moore RW, Eisen EJ, Ulberg LC, 1970. Genetic and uterine effects on survival in mice selected for body weight. *J Reprod Fertil* 23,271-275.

Morel PCH, Blair HT, Ormsby JE, Breier BH, McCutcheon SN, Gluckman PD, 1994. Influence of fetal and maternal genotype for circulating insulin-like growth factor I on fetal growth in mice. *J Reprod Fertil* 101, 9-14.

Peiró R, Santacreu MA, Climent A, Blasco A, 2007. Early embryonic survival and embryo development in two lines of rabbits divergently selected for uterine capacity. *J Anim Sci* 85, 1634-1639.

Pomp D, Cowley DE, Eisen EJ, Atchley WR, Hawkins-Brown D, 1989. Donor and recipient genotype and heterosis effects on survival and prenatal growth of transferred mouse embryos. *J Reprod Fertil* 86, 493-500.

Te Pas MFW, Freriksen JWM, van Bijnen AJHM, Gerritsen CLM, van den Bosch TJ, Harders FH, Verburg FJ, Visscher AH, de Greef KH, 2001. Selection for growth rate or against back fat thickness in pigs is associated with changes in growth hormone axis plasma protein concentration and mRNA level. *Dom Anim Endocrinol* 20, 165- 184.

Te Pas MFW, Visscher AH, de Greef KH, 2004. Molecular genetic and physiologic background of the growth hormone-IGF-I axis in relation to breeding for growth rate and leanness in pigs. *Dom Anim Endocrinol* 27, 287-301.

Torres S, Hulot F, Sevellec C, 1987. Early stages of embryonic development in two rabbit genotypes. *Reprod Nutr Dev* 27, 715-719.

Wilson ME, Ford SP, 1997. Differences in trophectoderm mitotic rate and P450 alphasubunit expression between late preimplantation Meishan and Yorkshire

conceptuses. *Biol Reprod* 56, 380-385.

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.

Youngs CR, Christenson LK, Ford SP, 1994. Investigations into the control of litter size in swine: III. A reciprocal embryo transfer study of early conceptus development. *J Anim Sci* 72, 725-731.



Experimento 3.3

**Este trabajo ha sido publicado en la revista "Reproduction in Domestic Animals" con la siguiente referencia: Saenz-de-Juano MD, Peñaranda DS, Marco-Jiménez F, Llobat L, Vicente JS, 2011. Differential mRNA expression in rabbit in vivo pre-implantatory embryos. Reprod Dom Anim 46, 567-272.*

3.3. Expresión diferencial de ARN mensajero en embriones *in vivo* preimplantacionales de conejo

3.3.1. Resumen

Con el fin de estudiar genes relacionados con el desarrollo embrionario y la implantación, se evaluó la expresión de un grupo de genes relacionados con pluripotencialidad, angiogénesis, proliferación, apoptosis y diferenciación en embriones de conejo. Para ello, se utilizaron un total de treinta hembras nulíparas de las que se obtuvieron 184 blastocistos producidos *in vivo* de 4, 5 y 6 días de desarrollo. Se utilizaron ocho muestras de blastocistos para cada momento de desarrollo y se analizó la expresión génica relativa de los transcritos factor de crecimiento vascular (VEGF), receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico (erbB3), factor de crecimiento transformante $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$) y factor de transcripción Oct4, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Se observaron diferencias significativas en la expresión relativa de Oct4, VEGF y TGF- $\beta 2$ entre los diferentes días de desarrollo. Los resultados mostraron un descenso de la expresión relativa de Oct4 en el día 4 y, por el contrario, una sobre-expresión de los transcritos VEGF y TGF- $\beta 2$ a los 6 días. Estos resultados corroboran la importancia tanto de VEGF como TGF- $\beta 2$ en el desarrollo embrionario y la implantación, y sugieren un posible papel regulador del Oct4 en factores angiogénicos. Por otro lado, no se encontraron diferencias en la expresión relativa de erbB3. El estudio de transcritos de genes específicos en embriones de conejo podría proporcionar nuevos marcadores de competencia de desarrollo embrionario y quizás, ser utilizado como una nueva herramienta de estudio de calidad embrionaria y desarrollo *in vitro*.

3.3.2. Introducción

Durante el desarrollo preimplantacional en mamíferos, el cigoto debe convertirse en un embrión competente y capaz de implantarse (Watson *et al.*, 2004). El desarrollo embrionario en la etapa de blastocisto y la diferenciación del útero es esencial para el establecimiento de la interacción útero-embrionaria y la progresión del proceso de implantación (Paria *et al.*, 2001). Hormonas esteroideas, factores de crecimiento, citoquinas, quimocinas y moléculas de adhesión, entre otros, participan en este diálogo preimplantacional (van Mourik *et al.*, 2009) y por tanto, una modificación o ausencia de estas moléculas puede alterar el proceso de implantación.

Pese a que la duración del período preimplantacional y el tipo de implantación difiere entre especies, los eventos iniciales como la aposición y adhesión entre embrión y útero, son comunes en mamíferos (Bazer *et al.*, 2009). El conejo es un buen modelo experimental en embriología y biología del desarrollo debido a sus características reproductivas (Yang y Foote, 1987). Así, es posible establecer tanto el momento exacto de la ovulación (entre 8 y 10 horas después de la inducción) como la cronología del desarrollo del embrión y de los momentos de aposición y adhesión (Hoffman *et al.*, 1998; Tao y Niemann, 2000; Lee y DeMayo, 2004). Alrededor del tercer día, empieza la formación del blastocisto que alcanza el cuerno uterino. En los tres días posteriores, previo al inicio del proceso de adhesión, el blastocisto se escapa y expande, causando la reacción decidual uterina (6-7 días). El trofoectodermo del conejo crea uniones que se adhieren y fusionan con la superficie apical (Hoffman *et al.*, 1998). En ese momento, la placenta coriolantoidea empieza su desarrollo que finalizará alrededor de los 12 días de gestación (Adams, 1960).

El factor de transcripción Oct4, codificado por el gen POU5F1, es considerado uno de los reguladores del sistema de mantenimiento de la pluripotencialidad y es esencial para el desarrollo embrionario preimplantacional (Nichols *et al.*, 1998; Boiani y Schöler, 2005). La principal función de este marcador es activar o reprimir varios genes

diana relacionados en muchos casos, con el desarrollo embrionario y fetal (Medvedev *et al.*, 2008). Debido a su importancia, los patrones de expresión de Oct4 han sido estudiados durante el desarrollo preimplantacional en numerosas especies, incluido el conejo (Mamo *et al.*, 2008). Al igual que ocurre en cerdos o bóvidos, en el desarrollo *in vitro* de blastocistos de conejo, se ha detectado la expresión de Oct4 tanto en la masa celular interna (MCI) como en las células del trofoectodermo (Kirchhof *et al.*, 2000; Kobolak *et al.*, 2009).

El desarrollo embrionario está regulado mediante la expresión específica, tanto temporal como espacial, de numerosos factores de crecimiento (Dadi *et al.*, 2009). Los factores de crecimiento epidérmico (EGFs) y sus receptores (erbBs) se expresan en las células tanto del tracto reproductivo materno como del embrión (Dadi *et al.*, 2009). La principal función de estas moléculas durante el desarrollo temprano embrionario es activar señales de mecanismos específicos intracelulares para el control de la proliferación celular, diferenciación y prevención de la apoptosis (Collins *et al.*, 1994). La familia erbB está constituida por cuatro receptores tirosín-quinasa (erbB1, erbB2, erbB3 y erbB4) con una función estructural común pero diferente especificidad de ligando y actividad quinasa (Carson *et al.*, 2000). Recientemente, estudios de silenciamiento génico post-transcripcional han mostrado que una disminución de la expresión de receptores de EGF produce un fallo en el desarrollo embrionario y en la formación de la placenta (Lee y Threadgill, 2009). Además, un aumento en la expresión de erbB en ratón conduce a un excesivo crecimiento placentario y a defectos en la fertilidad (Dackor y Threadgill, 2009). Después de invadir el endometrio, las células trofoectodérmicas son las responsables de alcanzar e invadir el endotelio y de promover la formación de nuevos vasos sanguíneos. El proceso angiogénico en la implantación requiere una compleja regulación molecular en la que intervienen, entre otros, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Dubinsky *et al.*, 2010). La expresión de VEGF, dado que es un elemento clave en la regulación de la

neovascularización, se ha detectado en diferentes especies, principalmente en tejido uterino, aunque también en embriones en estadio de blastocisto (Ferrara *et al.*, 1996; Ferrara y Davis-Smyth, 1997; Artini *et al.*, 2008). Además, se ha observado que miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) regulan la proliferación celular, diferenciación, adhesión, migración y muerte celular (Moustakas y Heldin, 2009). Durante la gestación, estos factores de crecimiento están asociados a procesos de remodelación del endotelio y desarrollo embrionario (Jones *et al.*, 2006). Díaz-Cueto y Gerton (2001) demostraron que los miembros del TGF- β regulan sucesos relacionados con la maduración y formación del blastocisto, así como las interacciones entre el embrión y el útero durante la implantación. En mamíferos, existen tres isoformas del TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) y todos ellos se han detectado en embriones preimplantacionales de ratón (Paria *et al.*, 1992). Entre ellos, se ha sugerido que el TGF- β 2 podría ser necesario para el mantenimiento del blastocisto diferenciado y receptivo a la implantación (Paria *et al.*, 1992). El propósito del presente experimento fue detectar y comparar la expresión diferencial de un grupo de genes candidatos relacionados con el desarrollo embrionario y la implantación en blastocistos de conejo de 4, 5 y 6 días de desarrollo *in vivo*.

3.3.3. Material y métodos

Recuperación de blastocistos

Se utilizaron treinta hembras nulíparas adultas pertenecientes a la línea A con el fin de obtener embriones preimplantacionales. Se obtuvieron un total de 184 blastocistos morfológicamente normales de hembras sacrificadas a los 4, 5 y 6 días de gestación. El rango de diámetros de los blastocistos recuperados a 4, 5 y 6 días fueron, respectivamente, de 244-375, 1511-2248 y 2255-2822 μm . Para la recuperación, se lavaron los cuernos uterinos con 20 ml de tampón fosfato salino Dulbecco (DPBS),

suplementado con un 1% de albúmina fetal bovina (BSA). Después de dos lavados, los blastocistos se guardaron Trizol (Invitrogen, S.A., Barcelona, España) con el fin de proceder a la extracción de ARN.

Extracción de ARN y transcripción reversa

Se extrajo el ARN total de ocho grupos distintos constituidos por 8-12 embriones de 4 días de desarrollo, 5-8 embriones de 5 días de desarrollo y 3 embriones de 6 días de desarrollo, utilizando el método de extracción convencional con fenol/cloroformo mediante sonicación en reactivo Trizol. Con el fin de prevenir la contaminación por ADN, el ARN obtenido (250 ng) se sometió a un tratamiento con desoxirribonucleasa (gDNA Wipeout Buffer, Qiagen Iberia, S.L., Madrid, España). Posteriormente, se realizó la transcripción reversa utilizando el kit de transcripción reversa Quantitec (Qiagen Iberia, S.L.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cebadores y genes de referencia

Para la PCR cuantitativa a tiempo real, se utilizó el gen de la Histona (H2afz) como gen de referencia o *'housekeeping'* dado que la expresión de su ARN mensajero no varía en los blastocistos a diferentes días de desarrollo (Mamo *et al.*, 2008). Para cada uno de los genes estudiados (VEGF, erbB3, TGF- β 2 y Oct4) se utilizaron cebadores específicos. El tamaño del fragmento amplificado por la PCR fue comprobado mediante el secuenciador CEQ-8000 (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU). El número de acceso en Genbank, así como la secuencia de los cebadores utilizados, el tamaño del fragmento amplificado y la referencia bibliográfica, en su caso, se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Cebadores utilizados en la PCR a tiempo real, número de acceso en GeneBank de los mismos, secuencia, tamaño del fragmento amplificado, eficiencia y correlaciones de las reacciones, exones amplificados y referencia, en su caso, para los genes histona (*H2afz*), transcrito del gen *POU5F1* (*Oct4*), factor de crecimiento del endotelio vascular (*VEGF*), receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico (*erbB3*) y factor de crecimiento transformante $\beta 2$ (*TGF- $\beta 2$*).

Gen	Número de acceso en GeneBank	Secuencia del cebador	Tamaño del fragmento (pb)	Eficiencia (%)	Correlación (r^2)	Exones	Referencia
Histona (<i>H2afz</i>)	AF030235	F5'-AGAGCCGGCTGCCAGTTCC	85	99,5	0,99		Mamo <i>et al.</i> (2008)
		R 5'-CAGTCGCGCCACACGTCC					
Oct4	NM_001099957	F 5'-CGAGTGAGAGGCAACTTGG	125	100,5	0,94		Mamo <i>et al.</i> (2008)
		R5'-CGGTTACAGAACCACACACG					
VEGF	AY196796	F5'-CTACCTCCACCATGCCAAGT	236	108	0,98	1-3	
		R5'-CACACTCCAGGCTTTCATCA					
erbB3	AF333179	F5'-GTCACATGGACACGATCGAC	191	96	0,98	4-6	
		R5'-AAAGCAGTGGCCGTTACTACT					
TGF- $\beta 2$	NM_001082660	F5'-GACCCACATCTCCTGCTAA	165	98	0,95	6-7	
		R5'-CACCCAAGATCCCTCTTGAA					

Ensayo SYBR Green (PCR cuantitativa a tiempo real)

Con el fin de monitorizar la expresión del ARN mensajero de los genes se utilizó el método de PCR cuantitativa a tiempo real con el termociclador de Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). Para ello, se realizó un paso inicial de 50°C durante 2 minutos seguido de una fase adicional de activación del enzima Taq polimerasa, que consistió en 95°C durante 10 minutos. El protocolo de PCR posterior consistió en 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos cada uno de ellos. Una vez finalizado el protocolo de PCR, el aparato realizó un análisis mediante curva de fusión o '*melting curve*' que consiste en un aumento progresivo de la temperatura desde 60 hasta 95°C, con un registro continuo de los cambios en la intensidad de fluorescencia. El volumen total utilizado para cada reacción de PCR fue de 20 μ L, compuesto por 5 μ L de muestra de ADN diluida, cebadores a derecha e izquierda (200 nM) y 10 μ L de Power Sybr Green PCR Master Mix 2X (Applied

Biosystems, Foster City, CA, EEUU). Para determinar la expresión relativa de cada uno de los genes candidatos se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001), utilizando el gen de la Histona (H2afz) como gen de referencia y la expresión de cada uno de los genes estudiados en los blastocistos de 4 días de desarrollo como calibrador.

Análisis estadístico

Una vez comprobada la normalidad de las variables, aquellas no normales (Oct4 y erbB3) fueron normalizadas mediante una transformación logarítmica. Las diferencias de expresión del ARN mensajero se estudiaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA), utilizando el procedimiento de modelo lineal generalizado del software Statgraphics Plus 5.1 (Addlink Software Científico, S.L., Barcelona, España). Se consideraron significativas las diferencias que mostraron un p-valor menor de 0,05.

3.3.4. Resultados

Se detectaron todos los transcritos de los genes estudiados. La expresión relativa del grupo de genes analizado a los 4, 5 y 6 días de desarrollo *in vivo* fue diferente dado que alguno de ellos se expresan en un momento de desarrollo concreto. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los blastocistos a 4, 5 y 6 días de desarrollo para la expresión de los genes Oct4, VEGF y TGF- β 2. La expresión relativa de Oct4 fue mayor en los blastocistos de 4 días, disminuyendo en los días posteriores (figura 16A). Por el contrario, la expresión de VEGF y de TGF- β 2 permaneció estable durante los días 4 y 5 de desarrollo, aumentando significativamente en el día 6 (figuras 16B y C). El análisis para el erbB3 no mostró diferencias significativas en su expresión génica relativa entre los tres períodos de desarrollo estudiados (figura 16D).

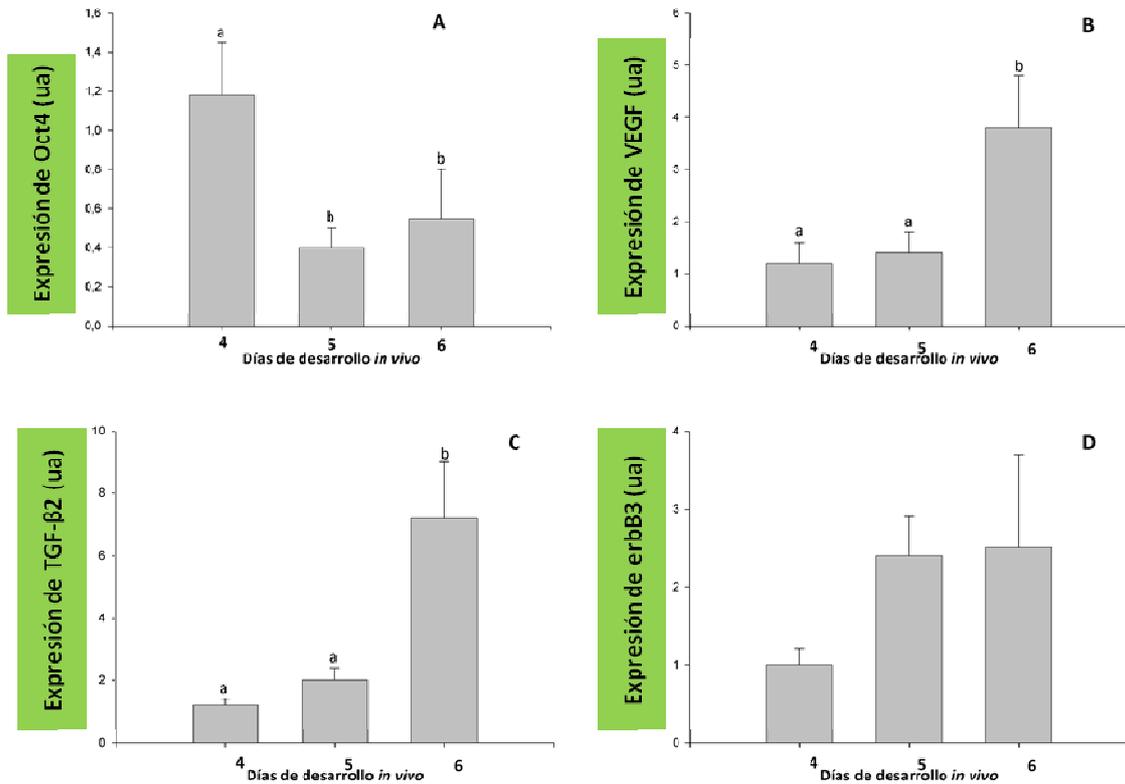


Figura 16. Expresión relativa del transcrito del gen *POU5F1* (*Oct4*, A), del factor de crecimiento del endotelio vascular (*VEGF*, B), del factor de crecimiento transformante $\beta 2$ (*TGF- $\beta 2$* , C) y del receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico (*erbB3*, D) en diferentes estadios de desarrollo *in vivo* de blastocistos. Los valores de abundancia relativa están expresados en unidades arbitrarias (ua), mostrando medias estimadas \pm error estándar para ocho réplicas en cada día de desarrollo. Valores con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas para los niveles de expresión del gen (p -valor $<0,05$).

3.3.5. Discusión

Los resultados muestran una importante divergencia en la expresión de ARN mensajero en embriones de 4, 5 y 6 días de desarrollo, de acuerdo con el tamaño del embrión y la proximidad a la implantación. Es probable que el gen *Oct4* sea el que mayor efecto tenga en el desarrollo de la potencialidad celular del embrión. También conocido como gen *POU5F1*, este gen es un factor de transcripción nuclear que es necesario para el mantenimiento de la pluripotencialidad celular, además de estar relacionado con la regulación de la expresión de otros genes (Boiani y Schöler, 2005; Medvedev *et al.*, 2008). Recientemente, Kobolak *et al.* (2009) han estudiado la expresión de *Oct4* en embriones de conejo desarrollados *in vitro*, encontrando una

expresión similar en blastocistos tempranos y escapados. En este experimento, sin embargo, se ha observado una mayor expresión en los blastocistos de 4 días frente a los de 5 y 6 días, probablemente como consecuencia de las diferencias en las tasas de desarrollo encontradas entre las condiciones *in vitro* e *in vivo* (Adams, 1970; Carney y Foote, 1991). Por otra parte, otros estudios han demostrado que el cultivo *in vitro* puede alterar la expresión de ARN mensajero en embriones (Rizos *et al.*, 2008). De hecho, la expresión de Oct4 es diferente en blastocistos desarrollados *in vitro* e *in vivo* en ratón (Li *et al.*, 2005) o bóvidos (Purpera *et al.*, 2009). En humanos, se ha documentado la inhibición de la expresión del ARN mensajero de la hormona coriónica gonadotrófica (hCG) por parte del Oct4 (Liu *et al.*, 1997). La hormona hCG, producida principalmente por el trofoblasto, actúa como superagonista de la hormona luteotrófica (LH), interactuando con el receptor uterino CG/LH (CG/LH-R) (Cameo *et al.*, 2004). La inmunorreactividad con el receptor CG/LH-R se ha demostrado en el endometrio de muchas especies, incluido el conejo (Jensen y Odell, 1998). Es conocido el papel de la hormona hCG en el control directo del reconocimiento materno durante la gestación, la regulación de la tolerancia inmunológica y el control de la diferenciación trofoblástica (Tsampalas *et al.*, 2010). Por tanto, la reducción del transcrito de Oct4 en blastocistos de 5 y 6 días de desarrollo en comparación con los de 4 días, podría considerarse como consecuencia del mecanismo intrínseco del embrión para permitir que tenga lugar la implantación. Además, la hormona hCG también presenta importantes efectos angiogénicos en el endometrio actuando sobre diferentes factores (Tsampalas *et al.*, 2010). En concreto, en etapas tempranas de la gestación, la expresión de VEGF se ha correlacionado con los niveles de estradiol y hCG (Evans *et al.*, 1998; Torry *et al.*, 2007). El VEGF se ha asociado con el proceso de angiogénesis *de novo* y con la conexión de los suministros sanguíneos embrionarios y maternos (Lee y DeMayo, 2004). Aún más, VEGF se ha detectado en útero de conejo a los 6 días de gestación (Das *et al.*, 1997) y, más recientemente, en blastocistos humanos (Artini *et al.*, 2008). Además de estos resultados, en este trabajo se ha detectado la expresión de VEGF en blastocistos de 4, 5 y 6 días de desarrollo, presentando estos últimos una expresión mayor. Por tanto, la reducción de la

expresión de Oct4 observada a los 5 y 6 días de desarrollo podría estar asociada con la mayor expresión de VEGF como consecuencia del incremento de la expresión de genes relacionados con la hCG. Al igual que en el caso de VEGF, los blastocistos también presentaron una mayor expresión de TGF- β 2 en el sexto día de desarrollo. El presente trabajo es el primero que demuestra la expresión de TGF- β 2 en blastocistos de conejo corroborando estudios anteriores donde ya se había demostrado que la secreción de TGF- β 2 por parte del blastocisto induce la apoptosis en las células del epitelio uterino, sugiriendo que este factor juega un importante papel en la señalización embrionaria durante la adhesión e implantación (Kamijo *et al.*, 1998; Nowak *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2006). Junto a esto, TGF- β 2 presenta también acciones inmunomoduladoras, inflamatorias y angiogénicas (Jones *et al.*, 2006; Bian *et al.*, 2007). De hecho, TGF- β 2 induce la expresión de VEGF y la secreción proteica en las células epiteliales pigmentadas de la retina humana (Naginei *et al.*, 2003; Bian *et al.*, 2007). De acuerdo con nuestros resultados, dicha correlación podría también ocurrir en las células del blastocisto ya que, tanto la expresión de TGF- β 2 como de VEGF aumentan de forma significativa en el mismo momento de desarrollo (a los 6 días de desarrollo).

Como ya se ha descrito anteriormente, debido a su participación en el diálogo entre el embrión y el endometrio materno del conejo, la expresión de factores de crecimiento durante el período preimplantacional es esencial para la implantación (Paria *et al.*, 2001). De hecho, tanto TGF- β 2 como VEGF y los receptores erbB están relacionados con la diferenciación del trofoblasto (Pidoux *et al.*, 2007). El gen erbB participa en la activación específica intracelular de vías de señalización para el control de la proliferación celular, diferenciación y prevención de la apoptosis (Collins *et al.*, 1994). Anteriormente, Klonish *et al.* (2001) detectó la presencia del receptor erbB3 en blastocistos y úteros de conejo a los 6 días de gestación. Los resultados del presente trabajo confirman la presencia de este receptor a los 6 días y demuestran la expresión de éste también en los días cuarto y quinto, pese a que no hemos encontrado diferencias de expresión entre estos días de desarrollo. Por ello, nuestros resultados sugieren que su principal función podría estar más relacionada con el crecimiento

embrionario y la diferenciación del blastocisto para la implantación. Esta hipótesis es acorde con otros estudios que indican que, tanto el EGF como sus receptores, juegan un papel crucial como reguladores en la diferenciación y proliferación celular (Dadi *et al.*, 2009).

En conclusión, los resultados demuestran que la expresión de Oct4, TGF- β 2 y VEGF varía en blastocistos de conejo producidos *in vivo* entre los días 4, 5 y 6 de desarrollo. Sin embargo, la expresión del erbB3 fue similar. La reducción de la expresión del transcrito Oct4 observada en los días 5 y 6 de desarrollo preimplantacional, en contraste con la sobre-expresión de VEGF y TGF- β 2, podría ser como consecuencia de una sobre-expresión de genes relacionados con efectos angiogénicos en el endometrio materno. Sin embargo, el Oct4 es más que un simple represor de la diferenciación del trofoectodermo, ya que regula multitud de genes, bien directamente o bien mediante la interacción con otros factores de transcripción (Schöler, 1991; Saijoh *et al.*, 1996; Ben-Sushan *et al.*, 1998; Botquin *et al.*, 1998; Zuccotti *et al.*, 2008). Por otra parte, la función del gen erbB3 está enfocada a la diferenciación y maduración del blastocisto, lo que parece descartar un papel esencial en la señalización embrionaria durante la adhesión e implantación. Por consiguiente, el análisis de transcritos de genes específicos en embriones preimplantacionales *in vivo* podría resultar una herramienta útil para futuros estudios sobre la calidad embrionaria y el efecto del desarrollo *in vitro* en embriones de conejo.

3.3.6. Bibliografía

Adams CE, 1960. Studies on prenatal mortality in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*: the amount and distribution of losses before and after implantation. *Endocrinology* 19, 325–344.

Adams CE, 1970. The development of rabbit eggs after culture *in vitro* for 1–4 days. *J Embryol Exp Morphol* 23, 21–34.

- Artini PG, Valentino V, Montleone P, Simi G, Parisen-Toldin MR, Cristello F, Cela V, Genazzani AR, 2008. Vascular endothelial growth factor level changes during human embryo development in culture medium. *Gynecol Endocrinol* 24, 184–187.
- Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G, 2009. Comparative aspects of implantation. *Reproduction* 138, 195–209.
- Ben-Shushan E, Thompson JR, Gudas LJ, Bergman Y, 1998. Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3 / 4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol Cell Biol* 18, 1866–1878.
- Bian ZM, Elnor SG, Elnor VM, 2007. Regulation of the VEGF mRNA expression and protein secretion by TGF- β 2 in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 84, 812–822.
- Boiani M, Schöler HR, 2005. Regulatory networks in embryoderived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 872–881.
- Botquin V, Hess H, Fuhrmann G, Anastassiadis C, Gross MK, Vriend G, Schöler HR, 1998. New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct4 and Sox-2. *Genes Dev* 12, 2073–2090.
- Cameo P, Srisuparp S, Strakova Z, Fazleabas AT, 2004. Chorionic gonadotropin and uterine dialogue in the primate. *Reprod Biol Endocrinol* 2, 50.
- Carney EW, Foote RH, 1991. Improved development of rabbit one-cell embryos to the hatching blastocyst stage by culture in a defined, protein-free culture medium. *J Reprod Fertil* 91, 113–123.
- Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessy BA, Yoshinaga K, 2000. Embryo implantation. *Dev Biol* 223, 217–237.
- Collins MK, Perkins GR, Rodríguez-Tarduchy G, Nieto MA, López-Rivas A, 1994. Growth factors as survival factors: regulation of apoptosis. *Bioessays* 16, 133–138.
- Dackor J, Li M, Threadgill DW, 2009. Placental overgrowth and fertility defects in mice with a hypermorphic allele of epidermal growth factor receptor. *Mamm Genome* 20, 339–349.

Dadi TD, Li MW, Kent Lloyd KC, 2009. Decreased growth factor expression through RNA interference inhibits development of mouse preimplantation embryos. *Comp Med* 59, 331–338.

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 periimplantation rabbit uterus. *Biol Reprod* 56, 1390–1399.

Díaz-Cueto L, Gerton GL, 2001. The influence of growth factors on the development of preimplantation mammalian embryos. *Arch Med Res* 32, 619–626.

Dubinsky V, Poehlmann TG, Suman P, Gentile T, Markert UR, Gutiérrez G, 2010. Role of regulatory and angiogenic cytokines in invasion of trophoblastic cells. *Am J Reprod Immunol* 63, 193–199.

Evans PW, Wheeler T, Anthony FW, Osmond C, 1998. A longitudinal study of maternal serum vascular endothelial growth factor in early pregnancy. *Hum Reprod* 13, 1057–1062.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW, 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439–442.

Ferrara N, Davis-Smyth T, 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrinol Rev* 18, 4–25.

Hoffman LH, Olso GE, Carson DD, Chilton BS, 1998. P4 and implanting blastocyst regulate Muc1 expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinology* 139, 266–271.

Jensen JD, Odell WD, 1998. Identification of LH/hCG receptors in rabbit uterus. *Proc Soc Exp Biol Med* 189, 28–30.

Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonse LA, 2006. TGF- β superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction* 132, 217–232.

Kamijo T, Rajabi MR, Mizunuma H, Ibuki Y, 1998. Biochemical evidence for autocrine/paracrine regulation of apoptosis in cultured uterine epithelial cells during mouse embryo implantation in vitro. *Mol Hum Reprod* 4, 990–998.

- Kirchhof N, Carnwath JW, Lemme E, Anastassiadis K, Schöler H, Niemann H, 2000. Expression pattern of Oct4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod* 63, 1698–1705.
- Klonish T, Wolf P, Hombach-klonish S, Vogt S, Kuechenhoff A, Tetens F, Fischer B, 2001. Epidermal growth factor-like ligands and erbB genes in the peri-implantation rabbit uterus and blastocyst. *Biol Reprod* 64, 1835–1844.
- Kobolak J, Kiss K, Polgar Z, Mamo S, Gaillard CR, Tancos Z, Bock I, Baji AG, Tar K, Pirty MK, Dinnyes A, 2009. Promoter analysis of the rabbit POU5F1 gene and its expression in preimplantation stage embryos. *BMC Mol Biol* 10, 88.
- Lee KY, DeMayo FJ, 2004. Animal models of implantation. *Reproduction* 128, 679–695.
- Lee TC, Threadgill DW, 2009. Generation and validation of mice carrying a conditional allele of the epidermal growth factor receptor. *Genesis* 47, 85–92.
- Li X, Kato Y, Tsunoda Y, 2005. Comparative analysis of development-related gene expression in mouse preimplantation embryos with different developmental potential. *Mol Reprod Dev* 72, 152–160.
- Liu L, Leaman DW, Villalta M, Roberts RM, 1997. Silencing of the gene for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin by the embryonic transcription factor Oct-3/4. *Mol Endocrinol* 11, 1651–1658.
- 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.
- 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.
- Medvedev SP, Shevchenko AI, Mazurok NA, Zakian SM, 2008. OCT4 and NANOG are the key genes in the system of pluripotency maintenance in mammalian cells. *Russ J Genet* 44, 1377–1393.
- Moustakas A, Heldin CK, 2009. The regulation of TGF β signal transduction. *Development* 136, 3699–3614.

- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebeniu D, Chambers I, Schöler HR, Smith A, 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct. *Cell* 95, 375–391.
- Nowak RA, Haimovici F, Biggers JD, Erbach GT, 2005. Transforming growth factor-beta stimulates mouse blastocyst outgrowth through a mechanism involving parathyroid hormone-related protein. *Biol Reprod* 60, 85–93.
- Paria BC, Jones KL, Flanders KC, Dey SK, 1992. Localization and binding of transforming growth factor-b isoforms in mouse preimplantation embryos and in delayed and activated blastocysts. *Dev Biol* 151, 91–104.
- Paria BC, Song H, Dey SK, 2001. Implantation: molecular basis of embryo-uterine dialogue. *Int J Dev Biol* 45, 597–605.
- Pidoux G, Gerbaud P, Tsatsaris V, Marpeau O, Ferreira F, Meduri G, 2007. Biochemical characterization and modulation of LH/ CG-receptor during human trophoblast differentiation. *J Cell Physiol* 212, 26–35.
- Purpera MN, Giraldo AM, Ballard CB, Hylan D, Godke RA, Bondioli KR, 2009. Effects of culture medium and protein supplementation on mRNA expression of in vitro produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 76, 783–793.
- Rizos D, Clemente M, Bermejo-Álvarez P, de La Fuente J, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A, 2008. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Domest Anim* 43, 44–50.
- Saijoh Y, Fujii H, Meno C, Sato M, Hirota Y, Nagamatsu S, Ikeda M, Hamada H, 1996. Identification of putative downstream genes of Oct-3, a pluripotent cell-specific transcription factor. *Genes Cells* 1, 239–252.
- Schöler HR, 1991. Octamania: the POU factors in murine development. *Trends Genet* 7, 323–329.
- Tao T, Niemann H, 2000. Cellular characterization of blastocysts derived from rabbit 4–8 and isolated blastomeres cultured in vitro. *Hum Reprod* 15, 881–889.
- Torry DS, Leavenworth J, Chang M, Maheshwari V, Groesch K, Ball ER, Torry RJ, 2007. Angiogenesis in implantation. *J Assist Reprod Genet* 24, 303–315.

Tsampalas M, Gridelet V, Berndt S, Foidart JM, Geenen V, d'Hauterive SP, 2010. Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *J Reprod Immunol* 85, 93–98.

van Mourik MS, Macklon NS, Heijnen CJ, 2009. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *J Leukoc Biol* 85, 4–19.

Watson AJ, Natale DR, Barcroft LC, 2004. Molecular regulation of blastocyst formation. *Anim Reprod Sci* 82, 583–592.

Yang XZ, Foote RH, 1987. Production of identical twin rabbits by micromanipulation of embryos. *Biol Reprod* 37, 1007–1014.

Zuccotti M, Merico V, Sacchi L, Bellone M, Brink TC, Bellazzi R, Stefanelli M, Redi CA, Garagna S, Adjaye J, 2008. Maternal Oct4 is a potential key regulator of the developmental competence of mouse oocytes. *BMC Dev Biol* 8, 97.

Experimento 3.4

**Este trabajo ha sido publicado en la revista "Reproduction in Domestic Animals" con la siguiente referencia: Llobat L, Marco-Jiménez F, Peñaranda DS, Saenz-de-Juano MD, Vicente JS, 2011. Effect of embryonic genotype on reference gene selection for RT-qPCR normalization. Reprod Dom Anim DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01934.x.*

3.4. Estudio del efecto del genotipo embrionario en la selección del gen de referencia para la normalización de la PCR cuantitativa a tiempo real

3.4.1. Resumen

Para obtener resultados con significado biológico fiable, es necesario normalizar los datos mediante el uso de un gen apropiado como control interno. En conejo, se han utilizado genes para esta normalización, estables tradicionalmente tanto en ovocitos como en blastocistos en estadios tempranos. Sin embargo, no se ha estudiado de qué forma afecta el genotipo del embrión a esta estabilidad. Los objetivos de este estudio han sido: (i) analizar la estabilidad a nivel transcripcional del ARN mensajero para los genes histona (H2afz) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en blastocistos de conejo de las líneas A y R, y (ii) estudiar su influencia en el significado biológico de las medias obtenidas para un conjunto de transcritos, como son el POU5F1 (Oct4), receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico (erbB3), factor de crecimiento transformante $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) e interferón γ (Ifn- γ). Los programas geNorm, NormFinder y BestKeeper revelaron resultados similares, indicando que ambos genes de referencia (H2afz y GAPDH) son más estables en blastocistos de la línea A. Además, este estudio indica que el genotipo embrionario afecta a la expresión del gen diana cuando se utiliza un único gen de referencia para analizar la expresión de ARN mensajero en blastocistos. Los resultados muestran que el gen GAPDH es mejor que el H2afz para estudios de expresión génica con diferentes genotipos embrionarios. El factor de normalización derivado de GAPDH y H2afz parece ser el más apropiado cuando la RT-qPCR se utiliza en embriones de conejo de diferente genotipo.

3.4.2. Introducción

El análisis cuantitativo de la expresión génica es fundamental en muchos campos de la investigación biológica. Se espera que la comprensión de los perfiles de expresión génica proporcione una mayor visión de las complejas redes reguladoras y, probablemente, conduzca a la identificación de genes relevantes en nuevos procesos biológicos o relacionados con enfermedades. La reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qRT-PCR) es una técnica precisa, sensible y repetible para el análisis de la expresión génica (Nailis *et al.*, 2006). Dado que este método permite una alta resolución y sensibilidad en la cuantificación, para obtener resultados seguros es necesario realizar correcciones en las variaciones de los resultados (Willems *et al.*, 2008). Se han realizado numerosos esfuerzos con el fin de estandarizar la variabilidad de la reacción de RT-qPCR mediante la inclusión de controles para la normalización muestral, utilizando múltiples genes de referencia de expresión estable y mediante correcciones de la eficiencia de la RT-qPCR así como de las variaciones entre experimentos, obteniendo datos experimentales más reales (Vandesompele *et al.*, 2002; Goossens *et al.*, 2005; Mamo *et al.*, 2008). Sin embargo, este procedimiento no está reconocido como un método robusto y potente para estandarizar las réplicas biológicas experimentales, dado que es complicado extraer conclusiones estadísticamente definitivas con un conjunto de datos limitado como consecuencia de la elevada variación entre experimentos (Pfaffl, 2001; Vandesompele *et al.*, 2002; Pfaffl *et al.*, 2004; Hellemans *et al.*, 2007).

El propósito de la normalización es reducir la variación no biológica todo lo posible. A menudo, el investigador necesita evaluar cuidadosamente si un gen de referencia se expresa de forma estable en el sistema experimental objeto de estudio. Cuando las medidas de expresión de ARN mensajero se normalizan de forma errónea se produce una mala interpretación de los resultados (Schmittgen y Zakrajsek, 2000; Tricarico *et al.*, 2002). Afortunadamente, se han desarrollado varios algoritmos con licencias libres enfocados a solucionar este problema. El denominado BestKeeper, basado en una

herramienta de Excel, analiza la variabilidad en la expresión de los genes candidatos mediante el cálculo de la variación de los datos del ciclo umbral y realizando un análisis comparativo basado en numerosas correlaciones emparejadas de todos los genes candidatos (Pfaffl *et al.*, 2004) (<http://www.genequantification.com/bestkeeper.html>). NormFinder es una aplicación de Visual Basic que ordena el conjunto de genes candidatos a gen de referencia de acuerdo con la estabilidad de su expresión en un diseño experimental y un conjunto de muestras determinado (Andersen *et al.*, 2004) (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.html>). Por último, geNorm es, probablemente, el algoritmo más utilizado para determinar el gen de referencia más estable y calcula el factor de normalización de la expresión génica para cada muestra de tejido basándose en la media geométrica de un número determinado por el usuario de genes de referencia (Hellemans *et al.*, 2007; Scharlaken *et al.*, 2008) (<http://medgen.ugent.be/wjvdesomp/genorm/>).

El estudio de la expresión génica durante el período preimplantacional requiere, por otro lado, disponer de un estándar endógeno que normalice los niveles de ARN con el fin de justificar las variaciones observadas (Robert *et al.*, 2002). Los genes que se han utilizado principalmente como genes de referencia en embriones preimplantacionales han sido: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), β -actina, 18S rRNA e histona (H2afz) (Robert *et al.*, 2002; Goossens *et al.*, 2005; Bower *et al.*, 2007). En concreto, en blastocistos de conejo se han valorado un total de 13 genes de referencia, resultando el gen H2afz y el gen hipoxantina fosforibosiltransferasa 1 (Hprt1) los que presentaban una mayor estabilidad (Mamo *et al.*, 2008). Sin embargo, estudios realizados por Navarrete-Santos *et al.* (2008) utilizan el gen GAPDH.

El objetivo de este experimento ha sido comprobar si el genotipo embrionario puede afectar al resultado final de expresión génica relativa y cómo la normalización de genes seleccionados influye en su significado biológico en blastocistos de conejo.

3.4.3. Material y métodos

Producción de embriones

Un total de 16 hembras, 8 de la línea A y 8 de la línea R, se llevaron a la monta con machos de fertilidad probada de su misma línea. Las hembras se sacrificaron a los seis días después de la monta y se recogieron los blastocistos mediante lavado de los cuernos uterinos con 10 mL de tampón fosfato salino Dulbecco suplementado con un 2% de suero de albúmina bovina. Para cada hembra, los embriones recuperados se evaluaron morfológicamente y se agruparon en bloques de cinco embriones desarrollados correctamente que se almacenaron en solución RNA later® (Qiagen Iberia SL, Madrid, España) hasta su extracción.

Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario

Se extrajo el ARN total de cada grupo de embriones mediante el método tradicional de extracción con fenol/cloroformo con sonicación en reactivo Trizol® (Invitrogen S.A., Barcelona, España). El ARN total se aisló en cloroformo y se precipitó con isopropanol, seguido de un lavado con etanol. El ARN se resuspendió en 10 µL de tampón de almacenado para ARN (Ambion, Austin, TX), y todas las alícuotas se guardaron a -80°C hasta su utilización. Con el fin de prevenir la contaminación por ADN, el ARN total fue sometido a un tratamiento con gDNA Wipeout Buffer (Qiagen Iberia S.L., Madrid, España) que contiene desoxirribonucleasa y se somete a un paso a 42°C durante 5 min. Posteriormente, el ADN complementario se obtuvo a partir de 1 µg de ARN total utilizando el kit comercial Reverse Transcription Quantitec kit (Qiagen Iberia, S.L., Madrid, España) y una mezcla de cebadores aleatorios y oligo-dT. Para detectar una posible contaminación con ADN, antes de la reacción de transcripción reversa, se realizó una PCR a tiempo real para genes diana utilizando como muestra el ARN total después del tratamiento con DNAsas.

Diseño de cebadores y análisis de secuencias

Se seleccionaron dos genes de referencia (H2afz y GAPDH) para la normalización en embriones de conejo, de acuerdo con Mamo *et al.* (2008) y Navarrete-Santos *et al.* (2008). Por otra parte, para la evaluación de los genes de referencia se utilizaron los genes POU5F1 (Oct4), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante β 2 (TGF- β 2), receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico (erbB3) e interferón γ (Ifn- γ). Se confirmó el tamaño del fragmento amplificado con electroforesis en gel de agarosa al 2% para todos los genes.

Tabla 12. Secuencias de los cebadores, número de acceso en GeneBank, tamaño del fragmento amplificado y referencia de los genes analizados y de los genes de referencia utilizado (H2afz: histona; GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; Oct4: transcrito de POU5F1; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; erbB3: receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico; TGF- β 2: factor de crecimiento transformante β 2; Ifn- γ : interferón γ).

Gen	Secuencia del cebador (5'-3')	Número de acceso	Tamaño del fragmento (pb)	Referencia
Histona (H2afz)	F: AGAGCCGGCTGCCAGTTCC R: CAGTCGCGCCACACGTCC	AF030235	85	Mamo <i>et al.</i> , 2008
GAPDH	F: GCCGCTTCTTCTCGTGACG R: ATGGATCATTGATGGCGACAACAT	L23961	144	Navarrete-Santos <i>et al.</i> , 2004
Oct4	F: CGAGTGAGAGGCAACTTGG R: CGGTTACAGAACCACACACG	NM_001099957	125	Mamo <i>et al.</i> , 2008
VEGF	F: CTACCTCCACCATGCCAAGT R: CACTCCAGGCTTTCATCA	AY196796	236	Saenz-de-Juano <i>et al.</i> , 2011
erbB3	F: GTCACATGGACACGATCGAC R: AAAGCAGTGGCCGTTACT	AF333179	191	Saenz-de-Juano <i>et al.</i> , 2011
TGF-β2	F: GACCCACATCTCCTGCTAA R: CACCCAAGATCCCTCTTGAA	NM_001082660	165	Saenz-de-Juano <i>et al.</i> , 2011
Ifn-γ	F: GTCTGCATTCTAGCCACTG R: ATTCAGGGGCAGTCACAGTT	NM_001081991	151	Llobat <i>et al.</i> , 2011

Condiciones y análisis de la RT-qPCR

Durante la cuantificación de los transcritos, el ensayo para cada uno de los genes se realizó sobre 8 muestras por línea, con un control negativo (donde el ADN complementario (cDNA) se sustituyó con agua) y un control positivo (muestras con expresión confirmada previamente). Todos los genes se compararon con el mismo grupo para evitar variaciones entre ensayos, y todas las cuantificaciones se realizaron consecutivamente sin interrupción. Cada muestra se analizó por duplicado y cada análisis se realizó con una dilución (1:50) de muestra de cDNA (5 μ L), 200 nM de cada cebador y 10 μ L de Power SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) en un volumen total de reacción de 20 μ L. Las condiciones de reacción fueron una desnaturalización de la muestra y una activación de la polimerasa a 95°C durante 10 min, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 sec y un último paso de unión y extensión a 60°C durante 1 min. Todas las reacciones se realizaron utilizando el termociclador a tiempo real 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). Con el fin de confirmar la especificidad de los productos de PCR, una vez finalizada la PCR, se realizaron curvas de fusión o '*melting curve*' para todos los genes. Para el cálculo de las eficiencias de la PCR, se generaron curvas estándar con cinco diluciones seriadas de las preparaciones de cDNA obtenidas con todas mezclas de blastocistos. Las eficiencias de la PCR (E) se calcularon con la ecuación $E = (10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$.

Análisis de la estabilidad para H2afz y GAPDH

Con el fin de comparar la estabilidad de transcripción de ARN mensajeros para los genes H2afz y GAPDH entre ambas líneas, el análisis estadístico realizado fue el siguiente. Cada muestra se analizó por duplicado y se utilizó el valor medio del ciclo umbral (Ct) como dato individual para todos los análisis estadísticos. El Ct y los valores cuantitativos para ambos genes de referencia se importaron a los programas informáticos geNorm (versión 3.5), NormFinder (versión 0.953) y BestKeeper

(versión1) para el cálculo. Cada software mostró la estabilidad de los distintos genes y de los datos de las curvas estándar de acuerdo con el método correspondiente de cada uno de ellos.

Expresión relativa para los genes Oct4, VEGF, TGF- β 2, erbB3 e Ifn- γ

Para evaluar la validez de los genes de referencia, se utilizó la expresión relativa de los genes mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001), utilizando H2afz y GAPDH, así como un factor de normalización calculado como la media geométrica de ambos. Se utilizó la expresión relativa de cada gen en la línea A como calibrador en todos los análisis.

Análisis estadístico

Los datos de RT-qPCR se analizaron mediante tres análisis independientes de la estabilidad de los genes de referencia con el software geNorm, NormFinder y BestKeeper. Estos tres métodos generan una medida de la estabilidad del gen (M) para cada uno de los genes; geNorm genera un valor arbitrario M para cada gen que, cuanto más por debajo de 1,5 esté, mayor estabilidad del gen entre las muestras representa. De forma similar, NormFinder genera una medida de la estabilidad en la que valores bajos indican un aumento de la estabilidad en la expresión génica y agrupa las muestras, permitiendo una estimación directa de variación en la expresión. BestKeeper genera coeficientes de correlación calculados de forma emparejada con cada gen y un índice BestKeeper (media geométrica de los valores del ciclo umbral (Ct) para genes de referencia agrupados).

Una vez normalizados los datos mediante una transformación angular, se analizaron los datos de expresión obtenidos para las réplicas biológicas independientes mediante un análisis de la varianza (ANOVA), utilizando el paquete informático SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EEUU, 2002). Se consideró significativo un p-valor menor de 0,05.

3.4.4. Resultados

Análisis de las eficiencias de la qPCR

Los valores de eficiencias fueron de 108,1% y 109,8% para H2afz y GAPDH, respectivamente, y los coeficientes de correlación (r^2) fueron de 0,95 y de 0,94 para H2afz y GAPDH (tabla 13).

Tabla 13. Parámetros de la curva estándar para el gen de la histona (H2afz) y del gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Gen	Pendiente (m)	Intersección (b)	Eficiencia (E)	Correlación (r^2)
H2afz	-3,14	16,57	108,1	95,0
GAPDH	-3,11	16,11	109,8	94,3

Análisis de la estabilidad de la expresión génica

La comparación de los resultados obtenidos mediante los tres algoritmos para H2afz y GAPDH muestra el efecto del genotipo en la expresión génica embrionaria (tabla 14). Según estos resultados, ambos genes de referencia, H2afz y GAPDH, resultaron más estables para el genotipo de la línea A que para la línea R. El gen H2afz muestra un pequeño incremento en el rango de estabilidad entre ambos genotipos, siendo mayor la estabilidad en la línea A.

Tabla 14. Valores de estabilidad de la expresión para los genes de la histona (H2afz) y gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH) para ambos genotipos embrionarios, calculados con los algoritmos geNorm, NormFinder y BestKeeper.

Gen	GeNorm		NormFinder		BestKeeper	
	Línea A	Línea R	Línea A	Línea R	Línea A	Línea R
H2afz	1,11	1,56	0,33	0,52	1,05	1,98
GAPDH	1,27	1,73	0,76	0,98	1,29	2,33

Perfiles de expresión para los genes Oct4, VEGF, TGF- β 2, erbB3 e Ifn- γ

Los niveles de expresión relativa de Oct4 y VEGF calculados mediante la normalización con H2afz, GAPDH y el factor de normalización (calculado como la media geométrica de ambos) se muestran en la figura 17 (A y B). El gen de referencia utilizado en la normalización afecta al cálculo final de la expresión de Oct4 y VEGF. La normalización utilizando el gen de referencia GAPDH y el factor de normalización produce resultados similares. Sin embargo, la normalización utilizando H2afz muestra diferencias en los niveles de los transcritos Oct4 y VEGF en blastocistos entre ambos genotipos. Por el contrario, los niveles relativos de los transcritos Ifn- γ , TGF- β 2 y erbB3 fueron similares entre ambos genotipos independientemente del gen de referencia utilizado para la normalización (figuras 17C, D y E).

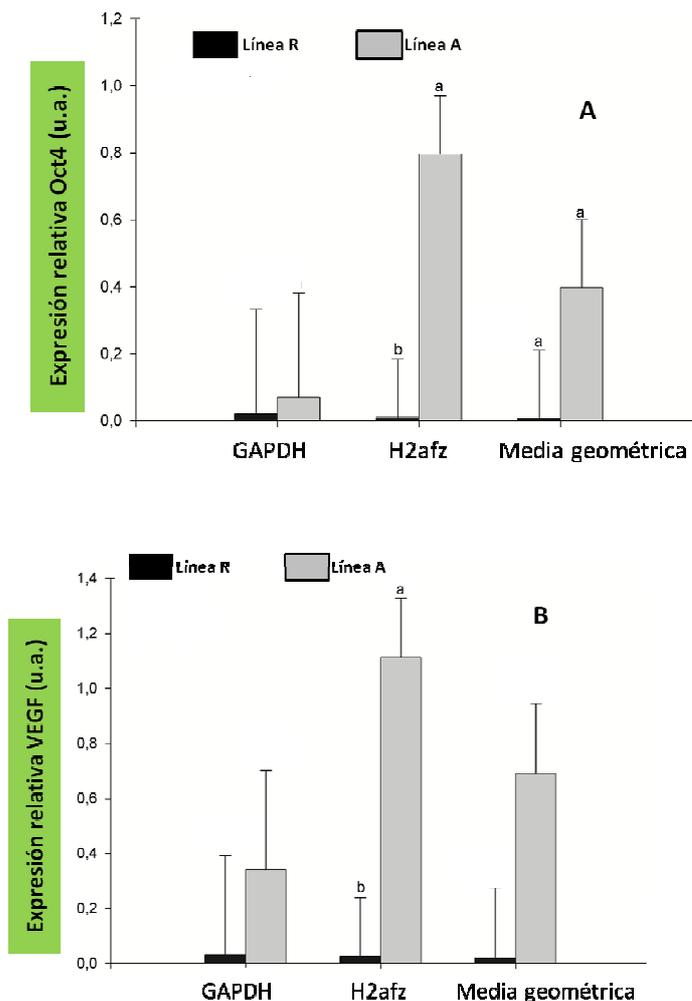


Figura 17A y B. En las figuras se muestran los niveles de expresión relativa para los genes POU5F1 (transcrito Oct4, A) y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, B), en blastocistos de dos genotipos diferentes normalizados con H2afz, GAPDH o bien, con la media geométrica de ambos genes de referencia. Los valores de expresión están expresados en unidades arbitrarias (ua), mostrando medias estimadas \pm error estándar. Los genes de referencia con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas para los niveles de expresión génica ($p < 0,05$).

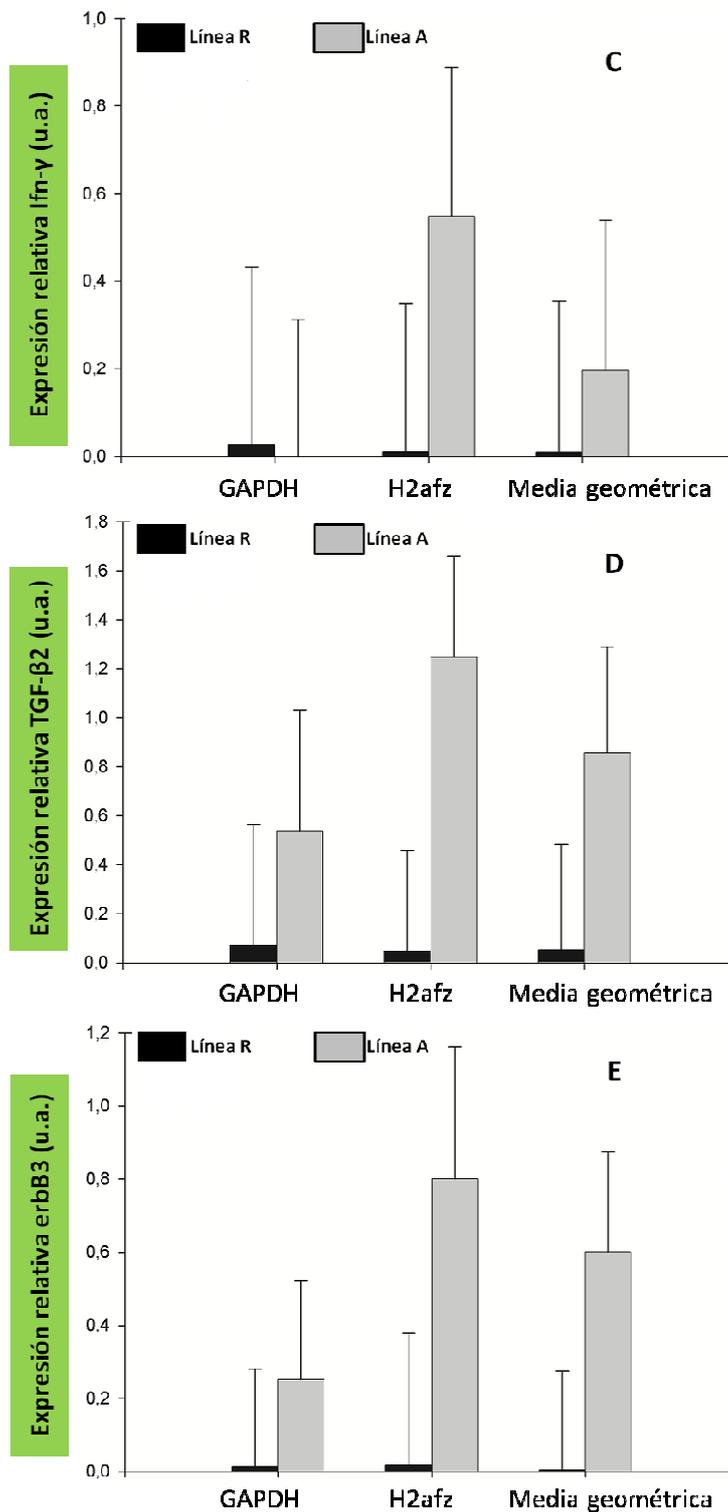


Figura 17C, D y E. En las figuras se muestran los niveles de expresión relativa para los genes interferón γ (Ifn- γ , C), factor de crecimiento transformante β 2 (TGF- β 2, D) y receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico (erbB3, E) en blastocistos de dos genotipos diferentes normalizados con H2afz, GAPDH o bien, con la media geométrica de ambos genes de referencia. Los valores de expresión están expresados en unidades arbitrarias (ua), mostrando medias estimadas \pm error estándar. Los genes de referencia con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas para los niveles de expresión génica ($p < 0,05$).

3.4.5. Discusión

Tanto las variaciones morfológicas como moleculares entre embriones de distintas especies de mamíferos han sido ampliamente discutidas (Bettegowda *et al.*, 2006; Kuijk *et al.*, 2007; Mamo *et al.*, 2008). Los efectos del estrés por calor durante el cultivo, la receptividad uterina y las etapas embrionarias en embriones preimplantacionales de conejo se han estudiado previamente (Makarevich *et al.*, 2007; Pierzynski *et al.*, 2007; Mamo *et al.*, 2008), así como en el experimento anterior. En el experimento actual, la comparación de los niveles de expresión en embriones de conejo entre dos genotipos indicó una diferente estabilidad en la expresión de mRNA de H2afz y GAPDH, independientemente del algoritmo utilizado. Ambos genes de referencia se han mostrado más estables para el genotipo embrionario de la línea A. La variación observada podría ser atribuida a las diferencias en los niveles de expresión, que pueden cambiar según el genotipo embrionario, como se ha demostrado en estudios previos en conejo (Mamo *et al.*, 2008) y ratón (Mamo *et al.*, 2007). Sin embargo, no puede descartarse la influencia de diferente ambiente uterino entre las líneas genéticas. La línea R mostró una elevada mortalidad prenatal que puede relacionarse con unos patrones esteroidogénicos anormales como se mostró en los resultados del primer experimento de esta tesis. Esta variabilidad introduce un sesgo considerable cuando los valores de los genes candidatos se corrigen mediante genes de referencia inconsistentes (Robert *et al.*, 2002). Por otra parte, Lazzari *et al.* (2011) han proporcionado evidencias sobre cómo el genotipo embrionario afecta a la expresión génica.

En ovocitos y embriones preimplantacionales de conejo, es preferible el uso de la media geométrica de tres genes de referencia (H2afz, tirosín 2-monooxigenasa/triptófano proteína de activación 5-monooxigenasa, polipéptido Z (Ywhaz) y Hprt1) para la evaluación de los niveles del transcrito Oct4 (Mamo *et al.*, 2008). En estudios previos, diversos genes (incluyendo β -actina y GAPDH) se han asumido como genes de referencia universales, sin evaluaciones adicionales, y se han

utilizado individualmente para normalizar los datos de expresión génica (Hugget *et al.*, 2005). En embriones de conejo y ratón, algunos de los genes utilizados para la normalización han resultado inapropiados (Mamo *et al.*, 2007 y 2008). Sin embargo, diversos estudios en blastocistos de conejo utilizan el gen GAPDH como gen de referencia (Navarrete-Santos *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2010; Ramin *et al.*, 2010). No obstante, la literatura presenta resultados controvertidos en la estabilidad de la expresión génica del gen de la histona (H2afz) y su utilización como gen de referencia en embriones preimplantacionales (Robert *et al.*, 2002; Bettegowda *et al.*, 2006).

Para estudiar el efecto del genotipo embrionario sobre ambos genes de referencia, se han normalizado los valores de expresión génica de los genes Oct4, VEGF, TGF- β 2, erbB3 e Ifn- γ , mediante cada uno de estos dos genes de referencia de forma individual y mediante un factor de normalización (media geométrica de ambos genes). Después de la normalización, GAPDH y el factor de normalización presentaron unos patrones de expresión similares para ambos genotipos embrionarios. Sin embargo, después de la normalización con H2afz, Oct4 y VEGF presentaron una menor expresión para la línea R. A pesar de que tradicionalmente se ha utilizado un único gen de referencia para la normalización, este método se ha criticado en numerosos estudios (Thellin *et al.*, 1999; Tricarico *et al.*, 2002; Dheda *et al.*, 2005; Bower *et al.*, 2007). El impacto de utilizar un gen de referencia inapropiado también ha sido discutido (Dheda *et al.*, 2005). Vandesompele *et al.* (2002) y Goossens *et al.* (2005) demostraron el error derivado de la utilización de un único gen de referencia y propusieron calcular un factor de normalización basado en la media geométrica de, al menos, tres genes de referencia estables. Sin embargo, el número de genes de referencia utilizados para la normalización depende de diversos factores (Vandesompele *et al.*, 2002; Mamo *et al.*, 2008).

Este experimento demuestra el efecto del genotipo embrionario cuando se utiliza un único gen de referencia en blastocistos de conejo. Los resultados muestran que el gen GAPDH es el más estable de los genes de referencia individualmente, pero la media

geométrica de los genes H2afz y GAPDH es preferible para la expresión relativa en blastocistos tardíos de conejo en estudios de genotipo embrionario.

3.4.6. Bibliografía

Andersen CL, Jensen JL, Orntofl TF, 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64, 5245-5250.

Bettegowda A, Patel O, Ireland JJ, Smith GW, 2006. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, Phosphoglycerokinase, β -glucuronidase, glyceraldehydes-3-phosphase dehydrogenase, β -actin and Histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. *Mol Reprod Dev* 73, 267-277.

Bower NI, Moser RJ, Hill JR, Lehnert SA, 2007. Universal reference method for real-time PCR gene expression analysis of preimplantation embryos. *Bio Techniques* 42, 199-206.

Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, Rook GAW, Zumla A, 2005. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem* 344, 141-143.

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.

Fischer S, Navarrete-Santos A, Thieme R, Ramin N, Fischer B, 2010. Adiponectin stimulates glucose uptake in rabbit blastocysts. *Biol Reprod* 110, 859-865.

Goossens K, Van Poucke M, Van Soom A, Vandesompele J, Van Zeveren A, Peelman LJ, 2005. Selection of references genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. *BMC Dev Biol* 5, 27.

Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J, 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* R19.

- Hugget J, Dheda K, Bustin S, Zumla A, 2005. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes and Immunity* 6, 279-284.
- Kuijk EW, du Puy L, van Tol HT, Haagsman HP, Colenbrander B, Roelen BAJ, 2007. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies in porcine oocytes and preimplantation embryos. *BMC Dev Biol* 7, 58.
- Lazzari G, Colleoni S, Duchi R, Galli A, Houghton FD, Galli D, 2011. Embryonic genotype and inbreeding affect preimplantation development in cattle. *Reproduction* 141, 625-632.
- 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.
- Llobat L, Marco-Jiménez F, Peñaranda DS, Thieme R, Navarrete A, Vicente SJ, 2011. mRNA expression in rabbit blastocyst and endometrial tissue of candidate gene involved in gestational losses. *Reprod Dom Anim* DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.1085.x.
- Makarevich AV, Olexikoval L, Chrenek P, Kubovicova E, Freharova K, Pivko J, 2007. The effect of hyperthermia in vitro on stability of rabbit preimplantation embryos. *Physiol Res* 56, 789-796.
- Mamo S, Gal AB, Bodo S, Dinnyes A, 2007. Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro. *BMC Dev Biol* 714.
- 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.
- Nailis H, Coenye T, Nieuwerburgh FV, Deforce D, Nelis HJ, 2006. Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. *BMC Mol Biol* 7, 25.
- Navarrete-Santos A, Tonak S, Kirstein M, Pantaleon M, Kaye P, Fischer B, 2004. Insulin acts via mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rabbit blastocysts. *Reproduction* 128, 517-526.

- 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, 515-524.
- Pfaffl MW, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP, 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes, and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26, 509-515.
- Pierzynski P, Gajda B, Smorag Z, Rasmussen AD, Kuczynski W, 2007. Effect of atosiban on rabbit embryo development and human sperm motility. *Fertil Steril* 87, 1147-1152.
- Ramin N, Thieme R, Fischer S, Schindler M, Schmidt T, Fischer B, Navarrete-Santos A, 2010. Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts. *Endocrinology* 151, 4158-4167.
- Robert C, McGraw S, Massicotte L, Pravetoni M, Gandolfi F, Sirard MA, 2002. Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos. *Biol Reprod* 67, 1465-1472.
- Saenz-de-Juano MD, Peñaranda DS, Marco-Jiménez F, Llobat L, Vicente JS, 2011. Differential mRNA expression in rabbit in vivo pre-implantatory embryos. *Reprod Dom Anim* 46, 567-572.
- Scharlaken B, de Graaf DC, Goossens K, Brunain M, Peelman LJ, Jacobs FJ, 2008. Reference gene selection for insect expression studies using quantitative real-time PCR: The head of the honeybee, *Apis mellifera*, after a bacterial challenge. *J Insect Sci* 33, 1-10.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA, 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 46, 69-81.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E, 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75, 291-295.

Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA, Orlando C, 2002. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* 309, 293-300.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 0034.1-0034.11

Willems E, Mateizel I, Kemp C, Cauffman G, Sermon K, Leyns L, 2006. Selection of reference genes in mouse embryos and in differentiating human and mouse ES cells. *Int J Dev Biol* 50, 627-635.

Experimento 3.5

**Este trabajo ha sido publicado en la revista "Reproduction in Domestic Animals" con la siguiente referencia: Llobat L, Marco-Jiménez F, Peñaranda DS, Thieme R, Navarrete A, Vicente JS, 2011. mRNA expression in rabbit blastocyst and endometrial tissue of candidate gene involved in gestational losses. Reprod Dom Anim DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01855x.*

3.5. Análisis de la expresión de ARN mensajero de genes candidatos relacionados con las pérdidas gestacionales en blastocistos y tejido endometrial

3.5.1. Resumen

La gestación es un fenómeno complejo en el que intervienen diferentes factores de crecimiento, citoquinas y proteínas de adhesión relacionadas con el desarrollo embrionario, la diferenciación y proliferación celular, interacción embrio-endometrial, angiogénesis, reconocimiento materno-embionario y crecimiento placentario y embrionario. En este experimento, se han estudiado las pérdidas preimplantacionales (hasta el día 6 de gestación), gestacionales (hasta el día 12 de gestación) y totales (desde la ovulación hasta el parto) en conejas multíparas no lactantes de dos líneas de conejo seleccionadas genéticamente por diferente criterio (líneas A y R). Por otro lado, se ha analizado la expresión relativa de factores relacionados con el proceso de implantación, como los transcritos Oct4, erbB3, TGF- β 2, VEGF e interferón γ , en endometrio y embriones de ambas líneas genéticas a los 6 días de gestación, así como la expresión relativa de genes relacionados con la gestación y el sistema de señalización IGF, como son IGF-I, IGF-II y sus receptores. Los resultados muestran similares pérdidas preimplantacionales en ambas líneas. Sin embargo, las pérdidas gestacionales en la línea R fueron superiores tanto hasta el día 12 de gestación como hasta el parto (9,5 % *versus* 22,4%, y 25,4% *versus* 50,2% para las líneas A y R, respectivamente). En cuanto a la expresión relativa de los distintos factores estudiados no se observaron diferencias entre ambas líneas ni en endometrio ni en embriones a los 6 días de gestación, excepto para el receptor de IGF-II que presentó, tanto en endometrio como en embriones, una expresión menor en la línea R. Esta menor expresión de IGF-IIR podría ser una posible explicación de las pérdidas gestacionales. La conclusión de este trabajo fue que la expresión de IGF-IIR tanto en blastocistos como en tejido endometrial a los seis días de gestación es menor en la línea R, aunque el significado biológico de este resultado en relación a las pérdidas gestacionales es desconocido todavía.

3.5.2. Introducción

El desarrollo endometrial y embrionario tienen lugar en un ambiente esteroideo que provoca la expresión de diversos factores de crecimiento, citoquinas y proteínas de adhesión relacionados con el proceso de implantación (van Mourik *et al.*, 2009). La identificación y estudio de estos factores y la interacción entre ellos podría mostrar su papel en el éxito o fracaso del proceso implantacional (Yoon *et al.*, 2004).

El desarrollo embrionario está mediado por genes como Oct4, Nanog y Sox2, o co-reguladores como Stat3, β -catenina, Myc o Sall4, que activan o reprimen los patrones de expresión de diferentes genes cruciales para la diferenciación celular en el desarrollo embrionario (Schöler, 1991; Li, 2010). Debido a su importancia, los patrones de expresión de Oct4 se han estudiado durante el desarrollo preimplantacional en numerosas especies, incluido el conejo, mostrando una disminución en la expresión de Oct4 a lo largo del desarrollo en diferentes trabajos (Kirchhof *et al.*, 2000; Mamo *et al.*, 2008; Kobilak *et al.*, 2009) al igual que en el tercer experimento de esta tesis.

La proliferación, diferenciación y prevención de la apoptosis en el embrión y células endometriales están mediadas por la regulación tanto espacial como temporal de varios factores de crecimiento (revisión de Collins *et al.*, 1994). Los factores de crecimiento epidérmico (EGFs) y sus receptores (erbB) se expresan tanto en células endometriales como en el embrión de rata (Johnson y Chatterjee, 1993; Tamada *et al.*, 1999), conejo (Klonish *et al.*, 2001) y ratón (Brown *et al.*, 2004; Dadi *et al.*, 2009). Recientemente, estudios sobre el silenciamiento génico post-transcripcional han demostrado que una disminución en la expresión de erbBs causa fallos en el desarrollo embrionario y en la formación de la placenta (Lee y Threadgill, 2009). Un aumento de la expresión de erbB conlleva una hipertrofia de la placenta, además de fallos en la fecundidad de ratón (Dackor *et al.*, 2009). Por otra parte, TGF- β 2 influye en la maduración y diferenciación de los blastocistos, además de estar asociado al proceso de remodelación endometrial y a la interacción embrio-endometrial (Kamijo *et al.*,

1998; Pauken y Capco, 1999; Díaz-Cueto y Gertnon, 2001; Shooner *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2006). Después de invadir el endometrio, las células trofoectodérmicas son las responsables de promover la vascularización del endometrio. Los factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGFs) tienen una compleja función reguladora de este proceso angiogénico a nivel molecular (Dubinsky *et al.*, 2010). La expresión de VEGF, dado que se trata de un mediador de la vascularización *de novo*, se ha detectado en diversas especies tanto en tejido uterino como en blastocistos (Ferrara *et al.*, 1996; Ferrara y Davis-Smyth, 1997; Artini *et al.*, 2008). Por otro lado, influye en la adhesión celular entre el embrión y el endometrio materno mediante la expresión de osteopontina e integrina (Lessey, 2002; Reynolds *et al.*, 2005). Además de esto, el sistema de factores de crecimiento similares a insulina (IGF-I y -II) está relacionado con el crecimiento y desarrollo, incluyendo el de placenta y embrión (Blakesley *et al.*, 1996). Este sistema incluye, además de estos dos ligandos, el receptor de IGF (IGF-IR), el receptor IGF-II/manosa-6-fosfato catión independiente (IGF-IIR) y el receptor de insulina (IR). El receptor IGF-IIR se une específicamente a IGF-II pero está desprovisto de capacidad de transducción de señal, con lo que su función principal con respecto a la acción del sistema IGF es como receptor que modula la biodisponibilidad de IGF-II extracelular (Hawkes y Kar, 2004; Scott y Firth, 2004). Por otra parte, IGF-IR está considerado mediador de la mayoría de los efectos biológicos tanto de IGF-I como de IGF-II (LeRoith *et al.*, 1995). Se ha observado que IGF-I estimula el crecimiento y desarrollo durante la embriogénesis en conejo (Herrler *et al.*, 1998) y, junto con IGF-II, favorece la adaptación angiogénica para la gestación (Dupont *et al.*, 2003; Herr *et al.*, 2003).

El reconocimiento materno-embriionario está relacionado habitualmente con diferentes citoquinas que previenen la activación local de células citotóxicas (Sharkey, 1998). Muchas de estas citoquinas son interferones (Ifn), íntimamente relacionados con el reconocimiento gestacional, como el Ifn- τ en rumiantes, Ifn- α en cerdos, Ifn- α e Ifn- β en humanos y los interferones Ifn- ω e Ifn- γ en conejos (Cross y Roberts, 1989; Aboagye-Mathiesen *et al.*, 1995; Charpigny *et al.*, 1998; Godornes *et al.*, 2007).

Pese a que la duración del período preimplantacional y la forma en la que la implantación se lleva a cabo difiere entre especies, los sucesos iniciales de este proceso como la aposición y anclaje del embrión al endometrio materno son comunes para todos los mamíferos (Bazer *et al.*, 2009). En este sentido, el conejo es un buen modelo experimental para el estudio de genes relacionados con el fenómeno de implantación debido al conocimiento exacto de su momento de ovulación, desarrollo embrionario, aposición y anclaje en el endometrio materno, además de ventajas adicionales como el hecho de existir líneas genéticas de conejo con eficiencias reproductivas muy diferentes.

El objetivo de este trabajo fue determinar la expresión de un conjunto de genes relacionados con el desarrollo embrionario y el proceso de implantación en blastocistos y endometrio a los 6 días de gestación con el fin de identificar genes candidatos relacionados con las pérdidas gestacionales.

3.5.3. Material y métodos

Diseño experimental

Este experimento fue estructurado en tres experiencias. La primera y segunda experiencias se realizaron en el Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (ICTA) de la Universidad Politécnica de Valencia, mientras que la tercera se llevó a cabo en el Departamento de Anatomía y Biología Celular de la Universidad Martin Luther de Halle-Saale (Alemania). En la primera de ellas, se caracterizaron las pérdidas gestacionales de dos líneas de conejo. En las experiencias posteriores se estudiaron, tanto en blastocistos como en tejido endometrial, las expresiones relativas de los ARN mensajeros de genes candidatos relacionados con estas pérdidas gestacionales. Concretamente, en la segunda experiencia se analizó la expresión relativa de ARN mensajero de un grupo de transcritos relacionados con el desarrollo embrionario y el proceso implantacional, como son Oct4, receptor 3 del factor de crecimiento

epidérmico (erbB3), factor de crecimiento transformante $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$), factor de crecimiento del epitelio vascular (VEGF) e interferón γ (Ifn- γ). Por último, la tercera experiencia se cuantificó la expresión relativa de genes relacionados con la señalización vía IGF, como son los factores de crecimiento similares a insulina I y II (IGF-I e IGF-II) y sus receptores (IGF-IR e IGF-IIR).

Experiencia 1. Tasas de pérdidas gestacionales en las dos líneas estudiadas

Para este estudio se utilizaron un total de 126 hembras multíparas no lactantes. Con el fin de caracterizar las pérdidas preimplantacionales, se sacrificaron 72 hembras a los 6 días después de la monta (36 por línea). Tanto los ovarios como el tracto reproductivo fueron extraídos, anotando el número de cuerpos lúteos y los embriones recuperados después de la perfusión de los cuernos uterinos con 10 ml de tampón fosfato salino Dulbecco (DPBS). Las pérdidas a 6 días de gestación se calcularon como la diferencia entre la tasa de ovulación y el número de embriones recuperados. Además, se determinó el tamaño de un total de 48 blastocistos por línea. Para ello, fueron fotografiados y se midió su diámetro medio con el programa Image J (versión 1.44).

Las pérdidas gestacionales se estudiaron en las 54 hembras restantes (27 por línea), tanto hasta 12 días de gestación (mediante laparoscopia de diagnóstico) como hasta el parto. Las hembras fueron anestesiadas mediante inyección intramuscular de 4 mg/Kg de xilacina (0,8 ml Rompún; Bayer AG, Leverkusen, Alemania), seguida de una inyección intravenosa de 0,4 ml/ Kg de peso de clorhidrato de ketamina (Imalgène 500; Merial, S.A., Lion, Francia). Se anotaron tanto la tasa de ovulación, como el número de embriones implantados. Igualmente, el tamaño de camada al nacimiento fue registrado para cada una de las hembras. El porcentaje de pérdidas a los 12 días de gestación se calculó como la diferencia entre la tasa de ovulación y el número de embriones implantados. El porcentaje de pérdidas al parto se calculó como la diferencia entre la tasa de ovulación y el tamaño de camada.

Experiencia 2. Expresión relativa de genes relacionados con el desarrollo embrionario y el proceso de implantación

Para este estudio se utilizaron un total de 16 hembras nulíparas (8 por línea) que fueron sacrificadas a los 6 días de gestación. Se recuperaron los embriones siguiendo el procedimiento explicado en la experiencia 1. De cada una de las hembras se utilizaron cinco embriones catalogados como normales, además de una muestra de endometrio que se obtuvo mediante apertura del cuerno uterino y raspado del endometrio, almacenando ambas muestras en solución RNA Later®(Qiagen Iberia S.L., Madrid, España) para su posterior extracción de ARN.

Extracción de ARN y transcripción reversa

El ARN se extrajo de cada grupo de embriones y del tejido endometrial siguiendo la extracción tradicional con fenol/cloroformo mediante sonicación en reactivo Trizol®. Con el fin de prevenir la contaminación por ADN, el ARN extraído (250 ng por muestra) fue sometido a un tratamiento de un paso con desoxirribonucleasa (Wipeout Buffer, Qiagen Iberia S.L., Madrid, España). Una vez realizado esto, se procedió a la transcripción reversa con el kit comercial Reverse Transcription Quantitec kit (Qiagen Iberia, S.L., Madrid, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cebadores y genes de referencia

Se ensayaron cebadores específicos para cada uno de los genes con el fin de evaluar la expresión relativa de Oct4, erbB3, TGF- β 2, VEGF e Ifn- γ en blastocistos y los genes erbB3, VEGF e Ifn- γ en tejido endometrial, utilizando en ambos casos, el gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen de referencia o 'housekeeping' (Apparao *et al.*, 2003; Navarrete-Santos *et al.*, 2004) en la reacción en

cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa (qRT-PCR). El tamaño del fragmento amplificado con los cebadores ensayados para cada uno de los transcritos fue evaluado utilizando electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. La secuencia de los cebadores utilizados, el número de acceso en GeneBank, el tamaño del fragmento amplificado y la referencia bibliográfica, en su caso, se muestran en la tabla 15.

Ensayo SYBR Green (PCR cuantitativa a tiempo real)

Con el fin de monitorizar la expresión del ARN mensajero de los genes se utilizó el método de PCR cuantitativa a tiempo real con el termociclador de Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). Para ello, se realizó un paso inicial de 50°C durante 2 minutos seguido de una fase adicional de activación del enzima Taq polimerasa, que consistió en 95°C durante 10 minutos. El protocolo de PCR posterior consistió en 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos cada uno de ellos. Una vez finalizado el protocolo de PCR, el aparato realizó un análisis mediante curva de fusión o *'melting curve'* que consiste en un aumento progresivo de la temperatura desde 60 hasta 95°C, con un registro continuo de los cambios en la intensidad de fluorescencia para confirmar la especificidad de la PCR. El volumen total utilizado para cada reacción de PCR fue de 20 µL, compuesto por 5 µL de muestra de ADN diluida, cebadores a derecha e izquierda (200 nM) y 10 µL de Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). Las muestras fueron analizadas por triplicado y para determinar la expresión relativa de cada uno de los genes candidatos, se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001), utilizando el gen GAPDH como gen de referencia para normalizar la expresión de los genes en blastocisto y endometrio (Navarrete-Santos *et al.*, 2004; Mamo *et al.*, 2008). Como calibrador, se utilizó la expresión relativa de cada uno de los genes en la línea A.

Experiencia 3. Expresión relativa de genes relacionados con el sistema de señalización IGF

Se obtuvieron las muestras de un total de 8 hembras nulíparas (4 por línea) sacrificadas a los 6 días de gestación. Los embriones se recuperaron como se describió en la primera experiencia. Para reducir la variabilidad de las muestras de embriones, después de agrupar a los embriones de cada una de las líneas, se constituyeron cuatro muestras con nueve embriones con desarrollo normal, además de una muestra de tejido endometrial de cada hembra, que se almacenaron del mismo modo que las muestras del apartado anterior. Tanto la extracción de ARN total, como la transcripción reversa y el análisis de qRT-PCR se realizaron como se ha explicado anteriormente. Para determinar la expresión relativa de cada uno de los genes, se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y se empleó el mismo gen de referencia (GAPDH) y calibrador (línea A) para la normalización.

Análisis estadístico

Para el estudio del efecto de la línea genética en los factores tasa de ovulación, diámetro de blastocisto, pérdidas a los 6 días de gestación, pérdidas a los 12 días de gestación, pérdidas a parto y expresión relativa de cada uno de los genes, se utilizó un análisis de la varianza. Previamente al análisis estadístico, se corroboró la normalidad de los datos y todas las variables de expresión relativa de ARN mensajero se sometieron a una transformación angular. Se consideraron significativas las diferencias que mostraron un p-valor inferior a 0,05 en todos los análisis, que se realizaron mediante el paquete informático SPSS 16.0 software package.

Tabla 15. Secuencias de los cebadores, número de acceso en GeneBank, tamaño del fragmento amplificado y referencia, si existe, de los genes analizados y del gen de referencia utilizado (VEGF, como factor de crecimiento del endotelio vascular; erbB3, como receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico; TGF- β 2 como factor de crecimiento transformante β 2; Oct4 como transcrito del gen POU5F1; Ifn- γ como interferón gamma; GAPDH como gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (gen de referencia); IGF-I como factor de crecimiento similar a la insulina I; IGF-II como factor de crecimiento similar a la insulina II; IGF-IR como receptor I del factor de crecimiento similar a la insulina y IGF-IIR como receptor II del factor de crecimiento similar a la insulina).

Gen	Secuencia del cebador (5'-3')	Número de acceso	Tamaño del fragmento (pb)	Referencia
VEGF	F: CTACCTCCACCATGCCAAGT R: CACACTCCAGGCTTTTCATCA	AY196796	236	Saenz-de-Juano <i>et al.</i> , 2011
erbB3	F: GTCACATGGACACGATCGAC R: AAAGCAGTGGCCGTTACT	AF333179	191	Saenz-de-Juano <i>et al.</i> , 2011
TGF-β2	F: GACCCACATCTCCTGCTAA R: CACCCAAGATCCCTCTTGAA	NM_001082660	165	Saenz-de-Juano <i>et al.</i> , 2011
Oct4	F: CGAGTGAGAGGCAACTTGG R: CGGTTACAGAACCACACACG	NM_001099957	125	Mamo <i>et al.</i> , 2008
Ifn-γ	F: GTCTGCATTCTAGCCACTG R: ATTCAGGGGCAGTCACAGTT	NM_001081991	151	
GAPDH	F: GCCGCTTCTTCGTGCAG R: ATGGATCATTGATGGCGACAACAT	L23961	144	Navarrete-Santos <i>et al.</i> , 2004
IGF-I	F: TGGTGGATGCTCTTCAGTTCGTGT R: GCTGATACTTCTGAGTCTTGGGCA	NM_001082026.1	237	
IGF-II	F: TGGAAGAAGTGGCCACGGAG R: GCTGCATTGCTGCTTACCGC	NM_001171406.1	286	
IGF-IR	F: CCAAGCTCACGGTCATCACTG R: ATGGGCTTCTCCTCCAAGGTCC	EF616472	347	Navarrete-Santos <i>et al.</i> , 2008
IGF-IIR	F: CGGCATGGCAACCTGTATGACC R: TGTCGATGGTCGGGCAGATGTC	*	127	

*Datos cedidos pero no publicados por Navarrete-Santos et al.

3.5.4. Resultados

Experiencia 1. Tasas de pérdidas gestacionales en las dos líneas estudiadas

Las dos líneas genéticas de conejo estudiadas presentaron similares tasas de ovulación y pérdidas preimplantacionales en el día 6 de gestación ($12,9 \pm 0,33$ versus $12,3 \pm 0,32$, y $11,9 \pm 3,5$ versus $16,6 \pm 3,5$ para las líneas A y R, respectivamente). Lo mismo ocurrió con el diámetro medio de los blastocistos ($2770 \pm 50 \mu\text{m}$). Sin embargo, estas dos líneas genéticas presentaron diferencias significativas en sus pérdidas gestacionales, tanto a 12 días de gestación como a parto. Las hembras de la línea R mostraron

pérdidas gestacionales en ambos períodos superiores a las observadas en las hembras de la línea A ($9,5 \pm 4,2\%$ y $25,4 \pm 5,6\%$, $22,4 \pm 4,0\%$ y $50,2 \pm 5,4\%$ hasta el día 12 de gestación (pérdidas gestacionales) y hasta el parto (pérdidas totales) para las líneas A y R respectivamente). En la tabla 16 se muestran los resultados obtenidos de tasas de ovulación y pérdidas gestacionales a lo largo de la gestación para ambas líneas.

Tabla 16. Tasa de ovulación, diámetro de blastocistos a 6 días de desarrollo in vivo y porcentajes de pérdidas gestacionales calculado como la diferencia entre la tasa de ovulación (TO) y el número de blastocistos a los 6 días, número de embriones implantados a los 12 días y tamaño de camada para las líneas A y R. Los datos se expresan como medias estimadas \pm error estándar. n: número de datos. ^{a, b} Valores con superíndice distinto en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

		TO	Diámetro de blastocistos a 6 días (μm)	Tasas de pérdidas gestacionales		
				A día 6	A día 12	A parto
Línea	A	$12,9 \pm 0,33$	2768 ± 50	$11,9 \pm 3,5$	$9,5 \pm 4,2^b$	$25,4 \pm 5,6^b$
	(n)	(62)	(36)	(36)	(26)	(26)
Línea	R	$12,3 \pm 0,32$	2772 ± 50	$16,6 \pm 3,5$	$22,4 \pm 4,0^a$	$50,2 \pm 5,4^a$
	(n)	(64)	(36)	(36)	(28)	(28)

Experiencia 2. Expresión relativa de genes relacionados con el desarrollo embrionario y el proceso de implantación

Se detectaron todos los transcritos estudiados en las muestras de blastocistos para ambas líneas. Sin embargo, éstas no presentaron diferencias significativas en la expresión relativa de los genes sometidos a estudio (figura 18). Lo mismo ocurrió con la expresión relativa de los transcritos estudiados en las muestras endometriales (figura 19).

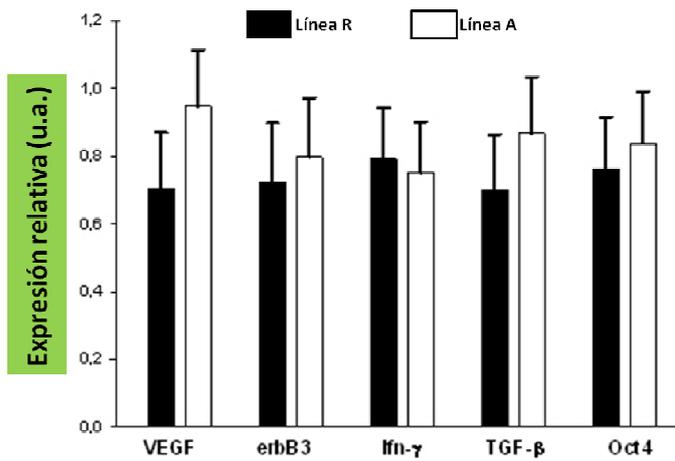


Figura 18. Expresión relativa en blastocistos del transcrito del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), del receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico (erbB3), del interferón γ (Ifn- γ), del factor de crecimiento transformante $\beta 2$ (TGF- β) y del gen POU5F1 (Oct4), en las diferentes líneas de conejo estudiadas. Los valores de abundancia relativa están expresados en unidades arbitrarias (ua), que muestran las medias estimadas \pm error estándar para ocho réplicas de cada una de las líneas estudiadas ($p < 0,05$).

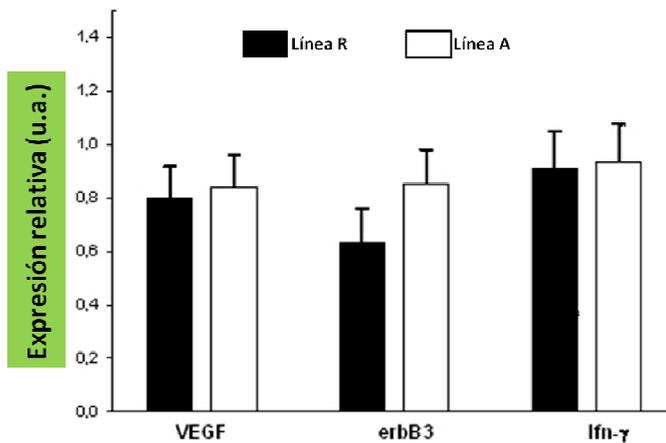


Figura 19. Expresión relativa en endometrio del transcrito del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), del receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico (erbB3), y del interferón γ (Ifn- γ) en las diferentes líneas de conejo estudiadas. Los valores de abundancia relativa están expresados en unidades arbitrarias (ua), que muestran las medias estimadas \pm error estándar para ocho réplicas de cada una de las líneas estudiadas ($p < 0,05$).

Experiencia 3. Expresión relativa de genes relacionados con el sistema de señalización IGF

Se encontró un patrón similar de expresión relativa de los transcritos relacionados con el sistema de señalización IGF, IGF-I, IGF-II e IGF-IR, tanto en blastocistos como en tejido endometrial de ambas líneas genéticas. Sin embargo, encontramos diferencias estadísticamente significativas en la expresión relativa del receptor IGF-IIR entre las líneas de conejo estudiadas tanto en blastocistos como en endometrio, siendo esta expresión inferior en la línea R (figuras 20 y 21).

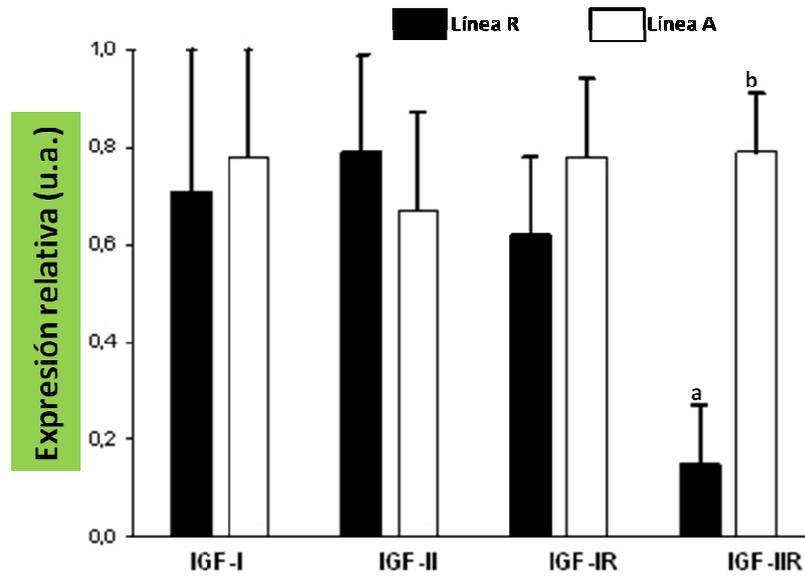


Figura 20. Expresión relativa en blastocistos de los factores de crecimiento similares a insulina (IGF-I e IGF-II), así como sus receptores (IGF-IR e IGF-IIR) en las diferentes líneas genéticas de conejo estudiadas. Los valores de abundancia relativa están expresados en unidades arbitrarias (ua), que muestran las medias estimadas \pm error estándar para las ocho réplicas en cada línea de conejo estudiada. ^{a, b} Valores con diferente superíndice difieren estadísticamente ($p < 0,05$).

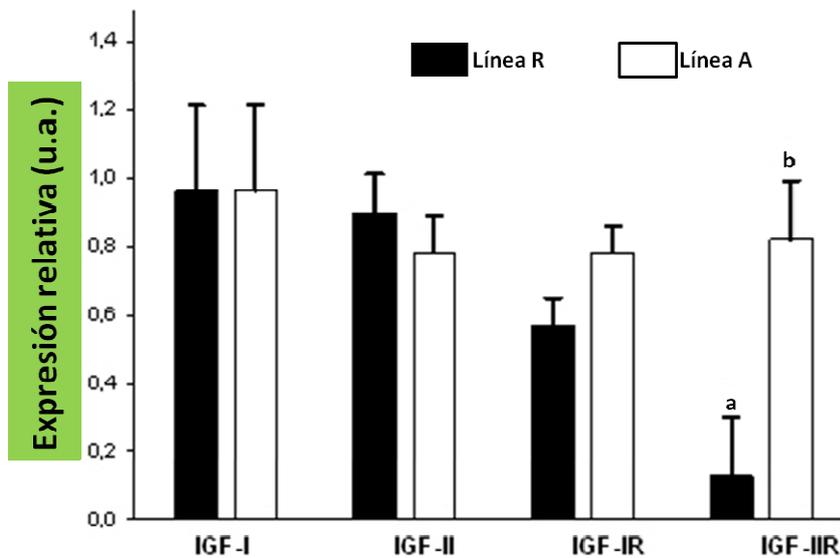


Figura 21. Expresión relativa en endometrio de los factores de crecimiento similares a insulina (IGF-I e IGF-II), así como sus receptores (IGF-IR e IGF-IIR) en las diferentes líneas genéticas de conejo estudiadas. Los valores de abundancia relativa están expresados en unidades arbitrarias (ua), que muestran las medias estimadas \pm error estándar para las ocho réplicas en cada línea de conejo estudiada. ^{a, b} Valores con diferente superíndice difieren estadísticamente ($p < 0,05$).

3.5.5. Discusión

Las pérdidas gestacionales en conejo se han estimado alrededor del 14% desde la fecundación hasta el momento de implantación en el endometrio (alrededor del día 7 de gestación) y entre el 20 y el 30% hasta el final de la gestación (Adams, 1960; Tao y Niemann, 2000; Mocé *et al.*, 2004; Santacreu *et al.*, 2005). En este experimento, los resultados en las pérdidas preimplantacionales (hasta el día 6 de gestación) han sido similares para ambas líneas, pero las pérdidas tanto hasta el día 12 de gestación como hasta el final de la misma han sido mucho mayores para la línea R. Los efectos negativos de la selección por velocidad de crecimiento en las características reproductivas, como la tasa de ovulación o la supervivencia embrionaria, ya se habían descrito previamente en ratón (Ernst *et al.*, 2000), pero la correlación genética entre ambas son contradictorias (Bünger *et al.*, 2005). La elevada ganancia de peso post-destete de la línea R respecto de la línea A (48,1 g/día frente a 37,5 g/día, Gómez *et al.*, 1999) podría tener consecuencias en sus características reproductivas, pero todavía no se ha demostrado una posible correlación genética. Las estimas genéticas de los parámetros son, a menudo, insuficientes para concluir una relación concreta entre ellos. En este sentido, las estimas de las correlaciones genéticas en conejo son inconsistentes, y se han observado estimas tanto positivas como negativas, posiblemente dependiendo de la línea utilizada o el criterio de selección. Recientemente, se ha observado una moderada y negativa correlación genética entre la ganancia de peso post-destete y los parámetros espermáticos (Lavara *et al.*, 2008a y 2008b). En contraste con estos resultados, Lavara *et al.* (2011) concluyen que no existen evidencias suficientes que sugieran que la selección por ganancia de peso o velocidad de crecimiento tenga un impacto negativo en la producción espermática y son necesarios más datos para mejorar las correlaciones genéticas.

En el conejo, las pérdidas gestacionales posteriores al sexto día de gestación dependen tanto del genotipo materno como del embrionario como demuestran los resultados del segundo experimento de esta tesis, aunque la relativa importancia de cada uno de

ellos es todavía desconocida (Wilson y Ford, 1997; Hoffman *et al.*, 1998; Mocé *et al.*, 2004). En este experimento, se ha estudiado la expresión relativa de determinados genes relacionados con el fenómeno de implantación en blastocistos y en tejido endometrial en momentos inmediatamente anteriores a ésta. El tercer experimento de esta tesis mostró una mayor expresión relativa de Oct4 en blastocistos a los 4 días de desarrollo *in vivo* frente a los de 5 y 6 días. La expresión del transcrito Oct4 en blastocistos se ha relacionado con la diferenciación celular y como señal de calidad embrionaria en numerosas especies (Dode *et al.*, 2006). En este experimento, no se han encontrado diferencias en la expresión de Oct4 en los blastocistos de ambas líneas a los seis días de gestación. Por otro lado, el Oct4 podría silenciar la expresión del ARN mensajero de genes como interferones o VEGF, o bien inhibir la expresión de la hormona coriónica gonadotrófica (hCG) (Liu *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 1998). Estos resultados podrían explicar en parte, el hecho de que la expresión de los transcritos VEGF e Ifn- γ también sea similar en blastocistos de ambas líneas. De la misma forma, la expresión de factores de crecimiento como el TGF- β 2, esencial para la implantación embrionaria y erbB a través de su receptor erbB3, relacionado con la activación de la señal que controla la proliferación celular, diferenciación y que previene la apoptosis (Collins *et al.*, 1994; Kamijo *et al.*, 1998; Klonish *et al.*, 2001; Paria *et al.*, 2001), han presentado similares niveles de expresión tanto en blastocistos como en endometrio de ambas líneas. Estos resultados podrían explicar las similares pérdidas preimplantacionales (hasta el día 6 de gestación) en ambas líneas, pero no las diferencias en las pérdidas hasta el día 12 y hasta el parto. Probablemente, el sexto día de gestación no sea el mejor momento para explicar las pérdidas post-implantacionales observadas hasta el día 12 y hasta el parto. En conejo, a partir del sexto día de gestación, existen dos momentos críticos para la supervivencia fetal. El primero se sitúa entre los días 8 y 12 de gestación, cuando tienen lugar los fenómenos de adhesión endometrial, reacción decidual y los primeros pasos de desarrollo de placentas hemocorial y fetal. El segundo, entre los días 17 y 24, corresponde al período de crecimiento uterino, cuando la placenta hemocorial ha finalizado su desarrollo y la nutrición fetal comienza a ser controlada por la placenta. Podrían ser interesantes

futuros estudios de la expresión de ARN mensajero en la placenta hemocorial entre los días 12 y 17 de gestación, con el fin de conocer las causas de sus elevadas pérdidas gestacionales en la línea R.

Cuando se ha estudiado la expresión genes relacionados con el sistema de señalización IGF (IGF-I y -II, y sus receptores) en relación a las pérdidas gestacionales hasta el día 12 de gestación y hasta el parto, únicamente el IGF-IIR presentó expresión relativa diferente en ambas líneas genéticas, siendo ésta menor en la línea R. IGF-IIR es importante para el control del crecimiento embrionario y para la internalización y degradación de IGF-II extracelular (revisiones de Braulte, 1999; Hassan, 2003). Sin embargo, la relación de este receptor con la señalización de IGF-II no se conoce totalmente. IGF-IIR une IGF-II con elevada afinidad pero interactúa de forma mínima con IGF-I y no se une a la insulina (Zhou *et al.*, 2003). Ratones *knock-out* para el gen de este receptor presentan mayores niveles séricos y tisulares de IGF-II, además de un incremento de peso al nacimiento (140% más que ratones control), y una inusual tasa de muerte perinatal (Lau *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994; Ludwig *et al.*, 1996; Louvi *et al.*, 1997). La línea R presenta un incremento de peso tanto a 25 como a 30 días de gestación respecto a la línea A (105% y 110%, respectivamente) (Vicente JS, datos no publicados). La mortalidad observada en ratones *knock-out* en ausencia de IGF-IIR parece ser causada por un exceso de IGF-II que se une a IGF-IR en ausencia de IGF-IIR (Ludwig *et al.*, 1996; Louvi *et al.*, 1997). Esto podría explicar parte de las pérdidas gestacionales de la línea R, pero se deberían analizar tanto los niveles séricos de IGF-II como los niveles de expresión de su receptor en la placenta.

En resumen, las diferencias gestacionales encontradas entre las dos líneas de conejo estudiadas no pueden ser explicadas por el patrón de expresión de estos genes candidatos, relacionados con el proceso implantacional y, únicamente la expresión génica de IGF-IIR en blastocistos y endometrio a los seis días de gestación es menor en la línea R. Serán necesarios estudios posteriores del transcriptoma mediante la utilización de *microarrays* o bien, mediante secuenciación de ARN a escala masiva, en

momentos posteriores al día 6 de gestación para definir tanto la expresión diferencial como la inmunolocalización tanto en blastocistos como en endometrio o, incluso, en tejido placentario, con el fin de evaluar el papel relativo de otros genes candidatos en las pérdidas gestacionales observadas.

3.5.6. Bibliografía

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.

Adams CE, 1960. Studies on prenatal mortality in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*: the amount and distribution of losses before and after implantation. *Endocrinology* 19, 325-344.

Apparao KBC, Illera MJ, Beyler SA, Olson GE, Osteen KG, Corjay MH, Boggess K, Lessey BA, 2003. Regulated expression of osteopontin in the peri-implantation rabbit uterus. *Biol Reprod* 68, 1484-1490.

Artini PG, Valentino V, Montleone P, Simi G, Parisen-Toldin MR, Cristello F, Cela V, Genazzani AR, 2008. Vascular endothelial growth factor level changes during human embryo development in culture medium. *Gynecol Endocrinol* 24, 184-187.

Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G, 2009. Comparative aspects of implantation. *Reproduction* 138, 195-209.

Blakesley VA, Scrimgeour A, Esposito D, Le Roith D, 1996. Signaling via the insulin-like growth factor-I receptor: does it differ from insulin receptor signaling? *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 153-159.

Braulke T, 1999. Type-2 IGF receptor: a multi-ligand binding protein. *Horm Metab Res* 31, 242-246.

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.

Bünger L, Lewis RM, Rothschild MF, Blasco A, Renne U, Simm G, 2005. Relationships between quantitative and reproductive fitness traits in animals (review). *Philos Trans R*

Soc Lond Biol Sci 360, 1489-1502.

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 -interferons. *Febs Letters* 228, 12-16.

Collins MK, Perkins GR, Rodriguez-Tarduchy G, Nieto MA, López-Rivas A, 1994. Growth factors as survival factors: regulation of apoptosis. *Bioessays* 16, 133-138.

Cross JC, Roberts RM, 1989. Porcine conceptuses secrete an interferon during the preattachment period of early pregnancy. *Biol Reprod* 40, 1109-1118.

Dackor J, Li M, Threadgill DW, 2009. Placental overgrowth and fertility defects in mice with a hypermorphic allele of epidermal growth factor receptor. *Mamm Genome* 20, 339-349.

Dadi TD, Li MW, Kent Lloyd KC, 2009. Decreased growth factor expression through RNA interference inhibits development of mouse preimplantation embryos. *Comp Med* 59, 331-338.

Díaz-Cueto L, Gerton GL, 2001. The influence of growth factors on the development of preimplantation mammalian embryos. *Arch Med Res* 32, 619-626.

Dode MA, Dufort I, Massicotte L, Sirard MA, 2006. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cells embryos. *Mol Reprod Dev* 73, 288-297.

Dubinsky V, Poehlmann, TG, Suman P, Gentile T, Markert UR, Gutiérrez G, 2010. Role of regulatory and angiogenic cytokines in invasion of trophoblastic cells. *Am J Reprod Immunol* 63,193-199.

Dupont J, Dunn SE, Barrett JC, LeRoith D, 2003. Microarray analysis and identification of novel molecules involved in insulin-like growth factor-1 receptor signaling and gene expression. *Recent Prog Horm Res* 58, 325-342.

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 Reprod Fertil* 118, 205-210.

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.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW, 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442.

Ferrara N, Davis-Smyth T, 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrinol Rev* 18, 4-25.

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.

Gómez EA, Baselga M, Rafel O, García ML, Ramon J, 1999. Selection, diffusion and performance of six Spanish lines of meat rabbit. *Cahiers Options Méditerranéennes* 41, 147-152.

Hassan AB, 2003. Keys to the hidden treasures of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor. *Am J Pathol* 162, 3-6.

Hawkes C, Kar S, 2004. The insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor: structure, distribution and function in the central nervous system. *Brain Res Rev* 44, 117-140.

Herr F, Liang OD, Herrero J, Lang U, Preissner KT, Han VK, Zygmunt M, 2003. Possible angiogenic roles of insulin-like growth factor II and its receptors in uterine vascular adaptation to pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 4811-4817.

Herrler A, Krusche CA, Beier HM, 1998. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biol Reprod* 59, 1302-1310.

Hoffman LH, Olso GE, Carson DD, Chilton BS, 1998. P4 and implanting blastocyst regulate Muc1 expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinology* 139, 266-271.

Johnson DC, Chatterjee S, 1993. Embryo implantation in the rat uterus induced by epidermal growth factor. *J Reprod Fertil* 99, 557-559.

Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonse LA, 2006. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction* 132, 217-232.

Kamijo T, Rajabi MR, Mizunuma H, Ibuki Y, 1998. Biochemical evidence for autocrine/paracrine regulation of apoptosis in culture uterine epithelial cells during mouse embryo implantation in vitro. *Mol Hum Reprod* 4, 990-998.

Kirchhof N, Carnwath JW, Lemme E, Anastassiadis K, Schöler H, Niemann H, 2000.

Expression pattern of Oct4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod* 63, 1698-1705.

Klonisch T, Wolf P, Hombach-Klonisch S, Vogt S, Kuechenhoff A, Tetens F, Fischer B, 2001. Epidermal growth factor-like ligands and erbB genes in the peri-implantation rabbit endometrium and blastocyst. *Biol Reprod* 64, 1835-1844.

Kobolak J, Kiss K, Polgar Z, Mamo S, Gaillard CR, Tancos Z, Bock I, Baji AG, Tar K, Pirty MK, Dinnyes A, 2009. Promoter analysis of the rabbit POU5F1 gene and its expression in preimplantation stage embryos. *BMC Mol Biol* 10, 88.

Lau MM, Stewart CE, Liu Z, Bhatt H, Rotwein P, Steward CL, 1994. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Dev* 8, 2953-2963.

Lavara R, García ML, Torres C, Vicente JS, Baselga M, 2008a. Genetic parameters for semen traits of rabbit males: I. Production, morphology, and sperm head morphometry. *Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, Verona (Italy)* 153-158.

Lavara R, García ML, Torres C, Vicente JS, Baselga M, 2008b. Genetic parameters for semen traits of rabbit males: II. Motility. *Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, Verona (Italy)* 159-162.

Lavara R, Vicente JS, Baselga M, 2011. Genetic parameter estimates for semen production traits and growth rate of a paternal rabbit line. *J Anim Breed Genet* 128, 44-51.

Lee TC, Threadgill DW, 2009. Generation and validation of mice carrying a conditional allele of the epidermal growth factor receptor. *Genesis* 47, 85-92.

LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr, 1995. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocrinol Rev* 16, 143-163.

Lessey BA, 2002. Adhesion molecules and implantation. *J Reprod Immunol* 55, 101-112.

Li YQ, 2010. Master stem cell transcription factors and signaling regulation. *Cell Reprogram* 12, 3-13.

Liu L, Leaman DW, Villalta M, Roberts RM, 1997. Silencing of the gene for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin by the embryonic transcription factor Oct-

3/4. *Mol Endocrinol* 11, 1651-1658.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25, 402-408.

Louvi A, Accili D, Efstratiadis A, 1997. Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Dev Biol* 189, 33-48.

Ludwig T, Eggenschwiler J, Fisher P, D'Ercloe AJ, Davenport ML, Efstratiadis A, 1996. Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in *Igf2* and *Igf1r* null backgrounds. *Dev Biol* 177, 517-535.

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.

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

Navarrete-Santos A, Tonack S, Kirstein M, Pantaleon M, Kaye P, Fischer B, 2004. Insulin acts via mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rabbit blastocysts. *Reproduction* 128, 517-526.

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, 515-524.

Paria BC, Song H, Dey SK, 2001. Implantation: molecular basis of embryo-uterine dialogue. *Int J Dev Biol* 45, 597-605.

Pauken CM, Capco DG, 1999. Regulation of cell adhesion during embryonic compactation of mammals embryos: roles for PKC and β -catenin. *Mol Reprod Dev* 54, 135-144.

Reynolds LP, Borowicz PP, Vonnahme KA, Johnson ML, Grazul-Bilska AT, Wallace JM, Caton JS, Redmer DA, 2005. Animal models of placental angiogenesis. *Placenta* 26, 689-708.

Santacreu MA, Móce ML, Climent A, Blasco A, 2005. Divergent selection for uterine capacity in rabbits. II. Correlated response in litter size and its components estimated

- with a cryopreserved control population. *J Anim Sci* 83, 2303-2307.
- Schöler HR, 1991. Octamania: the POU factors in murine development. *Trends Genet* 7, 323-329.
- Scott CD, Firth SM, 2004. The role of the M6P/IGF-II receptor in cancer: tumorsuppressionorgarbage disposal? *Horm Metab Res* 36, 261-271.
- Sharkey A, 1998. Cytokines and implantation. *Rev Reprod* 3, 52-61.
- Shoener C, Caron PL, Fréchette-Frigon G, Leblanc V, Déry MC, Asselin E, 2005. TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival. *Reprod Biol Endocrinol* 31, 3-20.
- 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.
- Tao T, Niemann H, 2000. Cellular characterization of blastocyst derived from rabbit 4-, 8- and 16-cell embryos and isolated blastomeres cultured in vitro. *Hum Reprod* 15, 881-889.
- Van Mourik MSM, Macklon NS, Heijnen CJ, 2009. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules and immune cells in establishing an implantation environment. *J Leukoc Biol* 85, 4-19.
- Wang ZQ, Fung MR, Barlow DP, Wagner EF, 1994. Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted *Igf2/Mpr* gene. *Nature* 372, 464-467.
- Wilson ME, Ford SP, 1997. Differences in trophoblast mitotic rate and P450 alpha-hydroxylase expression between late preimplantation Meishan and Yorkshire conceptuses. *Biol Reprod* 56, 380-385.
- Yamamoto H, Flannery ML, Kupriyanov S, Pearce J, McKercher SR, Henkel GW, Mari RA, Werb Z, Oshima RG, 1998. Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of *Ets2*. *Genes Dev* 12, 7883-7891.
- Yoon SJ, Choi DH, Lee WS, Cha KY, Kim SN, Lee KA, 2004. A molecular basis for embryo apposition at the luminal epithelium. *Mol Cell Endocrinol* 219, 95-104.
- Zhou R, Dhiehl D, Hoefflich A, Lahm H, Wol E, 2003. IGF-binding protein-4: biochemical characteristics and functional consequences. *J Endocrinol* 178, 177-193.



IV. DISCUSIÓN GENERAL

La fisiología y parámetros reproductivos, pautas de comportamiento y docilidad hacen del conejo, además de un modelo biomédico, 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 técnicas y manejos reproductivos propios.

La organización de la mejora genética en conejo se ha realizado tradicionalmente mediante el cruce a tres vías, siendo el producto final procedente del cruce entre dos líneas maternas seleccionadas por tamaño de camada y un macho procedente de una línea paternal seleccionada por velocidad de crecimiento (ganancia de peso diaria durante el cebo) (Baselga y Blasco, 1989). Dado que estos dos caracteres son fundamentales para la productividad, es necesario conocer la repercusión genética que el programa de selección por velocidad de crecimiento tiene sobre el otro carácter. Hasta el momento, los estudios sobre la correlación genética entre caracteres de crecimiento y reproductivos en el conejo han ofrecido a menudo resultados contradictorios, existiendo estudios con correlaciones positivas (Mgheni y Crhistensen, 1985; Camacho y Baselga, 1990) y negativas (Rochambeau *et al.*, 1989), aunque siempre las estimas de las correlaciones en uno u otro sentido han sido bajas. Algunos estudios en machos han establecido correlaciones negativas entre caracteres de crecimiento y calidad espermática. Así, Lavara *et al.* (2008) muestran una correlación negativa en la línea R entre la velocidad de crecimiento y características espermáticas, como producción o calidad seminal, no obstante éstas no fueron constatadas posteriormente para los parámetros de producción espermática (Lavara *et al.*, 2011).

Por lo tanto, es difícil establecer si el proceso de selección en conejo puede tener consecuencias sobre la eficiencia reproductiva, más aún si puede alterar la supervivencia prenatal y, consecuentemente, el tamaño de camada. Wilmut *et al.* (1986) ya indicaban la importancia de caracterizar y definir las causas de las pérdidas

gestacionales desde el punto de vista biológico, para entender el motivo por el que persisten a pesar de la selección natural enfocada a conseguir una reproducción eficiente, o bien desde el punto de vista práctico, utilizando este conocimiento para aumentar la supervivencia embrionaria. La línea R, seleccionada en la Universidad Politécnica de Valencia bajo el criterio de ganancia media diaria (Estany *et al.*, 1992) presenta, según hemos observado, graves deficiencias reproductivas, fallos en la inducción de la ovulación y un bajo tamaño de camada a pesar de presentar tasas de ovulación, fecundación y desarrollo embrionario hasta las 48 horas similares a la línea A o línea control.

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 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 70% de las hembras ovularon, resultado inferiores a los de la línea A, que presentó unos valores de inducción de la ovulación del 86%, tal como se muestra en el primer experimento. Estos fallos de inducción de la ovulación podrían deberse, por un lado, a una insuficiente sensibilidad hipotalámica-hipofisaria al 17β -estradiol, o bien, a causa de un deficiente reflejo neuro-endocrino que provoque la secreción de GnRH y la correspondiente descarga hipofisaria de FSH/LH. Sin embargo, cuando se utiliza inseminación artificial, de forma que la ovulación se induce con análogos de GnRH, las dos líneas se comportan de forma similar. Estos resultados parecen indicar que los fallos de ovulación de la línea R no son a causa de deficiencias a nivel de los receptores hipofisarios o foliculares de LH, sino que están más relacionados con factores que intervienen en la actividad hipotalámica, como los factores de crecimiento similares a insulina (IGF), leptina u otros factores relacionados con la esteroidogénesis (Shen *et al.*, 2007; Navarrete-Santos *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2008). Esta hipótesis deberá estudiarse en futuros

trabajos y tenerse en cuenta cuando se utilice la línea R para experimentos posteriores.

Para analizar el tamaño de camada de la línea R y, tras determinar que la tasa de ovulación no fue diferente entre las líneas A y R, independientemente de que las hembras utilizadas fuesen nulíparas o múltiparas, al igual que ocurrió con el porcentaje de fecundidad (82% para la línea R y del 90% para la línea A), se profundizó en los procesos de implantación y posterior desarrollo.

El desarrollo embrionario hasta 48 horas fue similar entre ambas líneas, que presentaron estadio de mórula temprana (>16 células) entre un 60 y un 65%. Tampoco existen diferencias entre las líneas A y R respecto a las pérdidas embrionarias hasta el sexto día de gestación, siendo éstas del 12% para la línea A y del 17% para la línea R, acordes con las publicadas en la bibliografía, que sitúan las pérdidas hasta el séptimo día alrededor del 14% (Tao y Niemann, 2000; Santacreu *et al.*, 2005).

Sin embargo, tal y como demuestran los resultados del primer y último experimento, el número de embriones implantados a los 12 días de gestación es mucho menor en las hembras de la línea R. Mientras que la línea A presenta unas pérdidas del 10%, la línea R presentó unas pérdidas de entre el 20% y el 30%. Durante la gestación, las pérdidas en la línea R siguen siendo mayores que en la línea A, de forma que si se estudian las pérdidas desde el día 12 de gestación hasta el parto, éstas ascienden al 50% en la línea R frente a un 25% de la línea A, siendo estas últimas similares a las publicadas por otros autores (Adams, 1960; Santacreu *et al.*, 2005). En el primer experimento se estudió la distribución de estas pérdidas de forma que, a lo largo de toda la gestación (pérdidas gestacionales), la línea R presenta un porcentaje del 60%, frente a un 30% para la línea A. Respecto a las pérdidas perinatales, calculadas como el porcentaje de gazapos vivos respecto de todos los gazapos nacidos, también fueron mayores en la línea R. Con estos datos, la línea R presentó unas pérdidas implantacionales, fetales,

gestacionales y perinatales de 30%, 40%, 60% y 15% respectivamente, resultados no habituales en la bibliografía.

Por otro lado, los niveles séricos de 17β -estradiol fueron inferiores en la línea R respecto a la línea A tanto a 12 como a 24 días de gestación. Estos resultados podrían explicar, parcialmente, las pérdidas fetales que ocurren en este período, dado que el estradiol regula, entre otros procesos, la secreción de progesterona, esencial para el mantenimiento de la gestación. De hecho, los niveles de progesterona a 24 días fueron inferiores en la línea R, lo que podría indicar que esta línea no mantiene unos niveles de progesterona suficientes para mantener la gestación de un número de fetos similar a los de la línea A (Browning y Wolf, 1981; Gadsby y Keyes, 1984).

Con el fin de determinar si las pérdidas gestacionales de la línea R dependían del genotipo materno o del embrionario, se diseñó el segundo experimento de esta tesis, donde se realizaron transferencias recíprocas entre las líneas R y A. Los resultados obtenidos demostraron que el genotipo materno afecta no sólo a la tasa de implantación, sino también al peso de la placenta fetal, factor determinante de la supervivencia embrionaria (Bradford, 1979; Klindt y Maurer, 1986; Pomp *et al.*, 1989). El efecto del genotipo embrionario parece fundamental en todas las etapas de la gestación, ya que se ha observado su influencia tanto en la tasa de implantación a 14 días, como en el número de fetos vivos a 25 días y en el tamaño de la placenta fetal. Resultados similares ya han sido publicados por otros autores en otras especies como cerdo (Ashworth *et al.*, 1990; Biensen *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998) o ratón (Hetherington, 1971; Al-Murrani y Roberts, 1978). Sin embargo, otros autores observaron mayor importancia del genotipo materno en otras líneas de conejo, seleccionadas por diferentes criterios (Mocé *et al.*, 2004). De esta forma, la línea R presenta un efecto en la supervivencia embrionaria hasta los 14 días y en la supervivencia fetal hasta los 25 días, tanto si sus embriones se transfieren a su misma línea, como si se transfieren a la línea A. Sin embargo, las hembras de la línea R

favorecen el porcentaje de embriones implantados, ya sean éstos de su misma línea o de la línea A.

En resumen, este primer bloque de experimentos pone de manifiesto que las pérdidas después de la implantación, en las que influye tanto el genotipo embrionario como el materno, podrían explicarse, en parte, por las deficiencias de la línea R en sus niveles de 17β -estradiol, que están relacionados con las deficiencias en progesterona (Boiti *et al.*, 2003 y 2004). La relación que indican estos mismos autores del efecto de estos menores niveles de 17β -estradiol con el metabolismo oxigénico, así como en la producción de citoquinas en las últimas etapas de la gestación se deberá estudiar en futuros trabajos, donde se tendrán en cuenta la producción de metabolitos relacionados con estos procesos y cómo afectan a la función endometrial.

Dado que a las 48 horas, los embriones de ambas líneas no presentan diferencias en sus niveles de desarrollo y a los 6 días post-fecundación no hubo diferencias entre el número de blastocistos entre una y otra línea, parece que las pérdidas embrionarias observadas a los 12 días se producen a partir del sexto día (adhesión, implantación y desarrollo). El segundo bloque de experimentos se centró en el estudio de los mecanismos moleculares de este proceso en ambas líneas y, concretamente, en la expresión génica relativa de genes relacionados con estos procesos que, por otra parte, están regulados de forma esteroidea (Funk y DeMayo, 1998).

En primer lugar, era necesario establecer qué momento previo a la implantación es clave para que el proceso se lleve a cabo correctamente, además de la puesta a punto de la cuantificación relativa de la expresión génica de los genes objeto de estudio. De esta forma, se realizó el tercer experimento de esta tesis, donde se puso a punto la técnica y se estudió cómo variaba la expresión génica en los días previos a la implantación, concretamente a los cuatro, cinco y seis días de gestación. Para este experimento se utilizaron embriones de la línea A, sobre los que se estudió la expresión génica de cuatro genes relacionados con el desarrollo embrionario (Oct4), la

vascularización (VEGF), la interacción entre endometrio y embrión (TGF- β 2) y la proliferación y diferenciación celular (erbB3), procesos necesarios para que los embriones lleven a cabo de forma correcta su implantación en el endometrio. Los resultados obtenidos demostraron que los embriones durante el cuarto día de gestación presentan unos elevados niveles de Oct4, que disminuyen a partir de este momento, de forma que entre los días 5 y 6 no se observan diferencias en los niveles de expresión relativa para este factor de transcripción, relacionado con la pluripotencialidad celular y la preparación del embrión para la implantación mediante la inhibición de la hormona hCG (Liu *et al.*, 1997; Tsampalas *et al.*, 2010). Esto muestra que, a partir del quinto día, los embriones están preparados para la implantación y, más concretamente, para interactuar con el endometrio y provocar por parte del mismo, las reacciones deciduales necesarias para que ésta se lleve a cabo correctamente. Por su parte, la expresión relativa de VEGF y de TGF- β 2 era similar entre los días 4 y 5, mientras que su expresión aumentaba de forma drástica en el sexto día. Ambos transcritos son necesarios para promover, por un lado, la vascularización y la formación de la interacción útero-placentaria en el caso del VEGF y, por otro, la diferenciación embrionaria y las interacciones útero-embriónicas (Paria y Dey, 1990; Pauken y Capco, 1999; Valdés *et al.*, 2008). A la luz de estos resultados, el blastocisto de seis días muestra la expresión de genes importantes para el proceso de implantación, momento en el que el embrión no sólo se ha diferenciado celularmente, sino que empieza a producir factores necesarios para la angiogénesis y la interacción útero-embriónica.

Dado que algunos autores han mostrado que los niveles de expresión pueden variar según el genotipo (Mamo *et al.*, 2007 y 2008), se realizó el cuarto experimento con el fin de determinar cuál sería el mejor gen de referencia para el último experimento, ya que los estudios desarrollados por Lazzari *et al.* (2011) ponen de manifiesto el efecto del genotipo embrionario en el desarrollo preimplantacional. Los resultados obtenidos mostraron que, si bien la estabilidad del gen H2afz dependía del genotipo, los resultados para el GAPDH y para la media geométrica entre éste y el H2afz, no se veían

afectados por el genotipo de las muestras estudiadas. Este hecho, junto a estudios de expresión génica donde el GAPDH ha sido utilizado ampliamente en conejo, tanto en embriones como en tejido endometrial (Navarrete-Santos *et al.*, 2008), condujo a la utilización de este gen como gen de referencia para el último experimento con ambos genotipos.

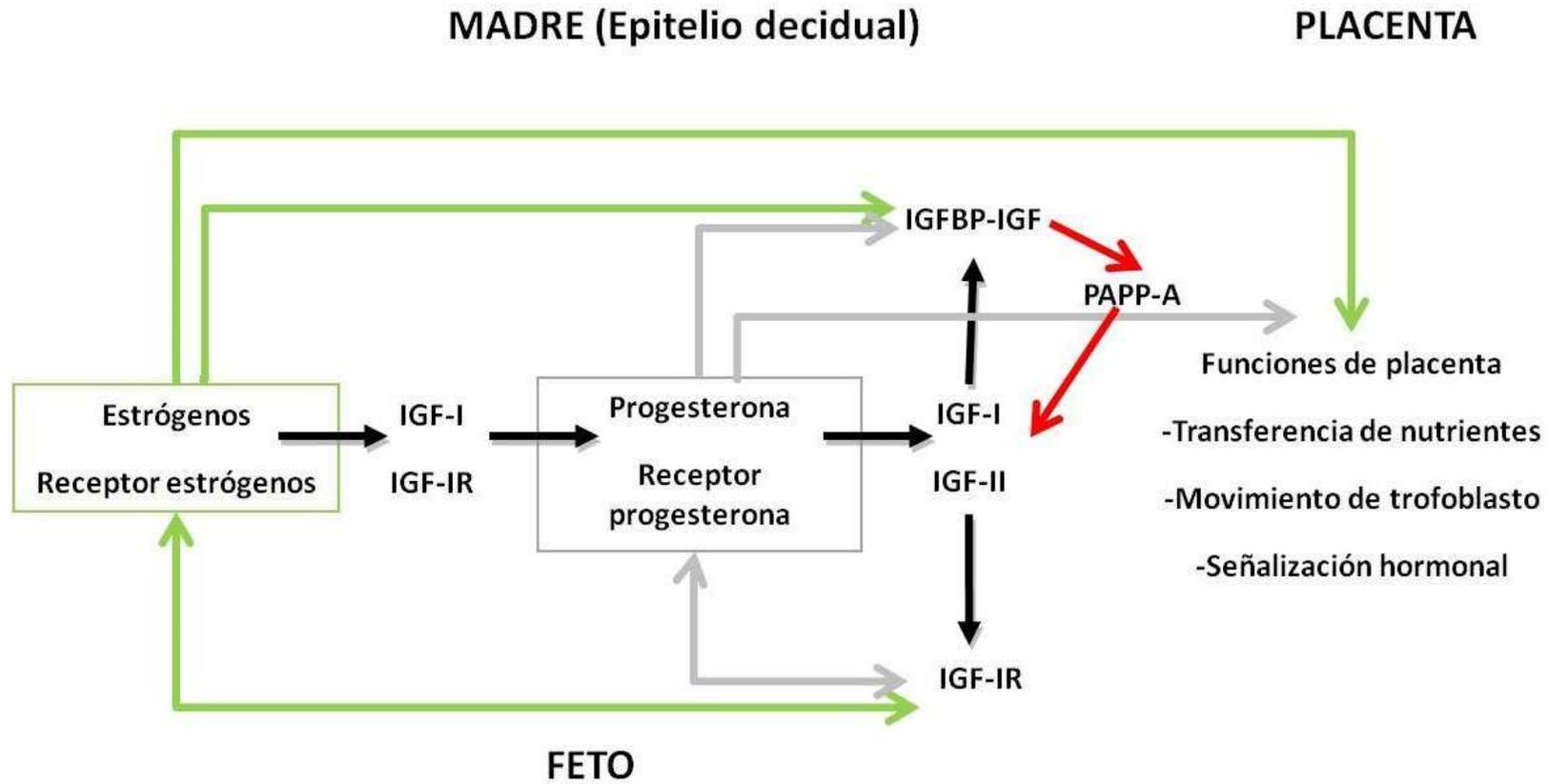
Por otra parte y dado que en las pérdidas embrionarias influye no sólo el genotipo embrionario, sino también el materno, se diseñó el último experimento de esta tesis, donde se estudió la expresión génica del embrión y del endometrio en el sexto día de gestación. De esta forma, en el último experimento se estudió la expresión relativa tanto de genes relacionados con el desarrollo embrionario y el proceso de implantación (Oct4, erbB3, TGF- β 2, VEGF e Ifn- γ en embriones; erbB3, VEGF e Ifn- γ en endometrio), como de genes relacionados con el sistema de señalización IGF (IGF-I, IGF-II y sus receptores) tanto en embriones como en endometrio. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias en el primer grupo de genes. Sin embargo, se demostró una menor expresión de IGF-IIR tanto en embriones como en tejido endometrial de la línea R. Dado que el IGF-IIR está implicado en el crecimiento fetal y el desarrollo (Eggenschwiler *et al.*, 1997), regula el papel del IGF-II en el crecimiento placentario (Lau *et al.*, 1994) y, además, está implicado en el control de la angiogénesis y la vascularización (Volpert *et al.*, 1996; Herr *et al.*, 2003), estos bajos niveles de este receptor podrían explicar, en parte, las pérdidas embrionarias de la línea R. Los resultados de Pringle y Roberts (2007) en humano sugieren que el IGF-IIR promueve la placentación durante las primeras fases de la gestación, de forma que una carencia del mismo podría explicar las pérdidas en estas primeras etapas. También se ha relacionado la disminución de la expresión de IGF-IIR con dos síndromes metabólicos que desencadenan una menor supervivencia gestacional, como el Síndrome de Descendencia Grande (Large Offspring Syndrome-LOS), que conllevaría menor espacio disponible para el feto, y el síndrome Beckwith-Wiedemann en humanos, que produce un exceso de crecimiento (Reik y Maher, 1997), lo que también estaría de acuerdo con los mayores pesos de los gazapos de la línea R publicados (Gómez *et al.*,

1999). Dado que ambos síndromes se producen por problemas en el procesamiento de este gen, en relación con el 'imprinting' y la metilación del mismo, sería interesante en futuros trabajos, estudiar la estructura que presenta dicho gen en la línea R.

Una de las funciones propuestas para el receptor IGF-IIR es retirar de la circulación el factor IGF-II, dada la actuación de este receptor que se une a esta molécula y la invagina (Czech, 1989). Lau *et al.* (1994) demostraron que ratones modificados genéticamente con deleciones en los exones 11 y 13 del gen de IGF-IIR, presentaban un 25-30% más en incremento de peso que sus congéneres y un aumento en los niveles de IGF-II en plasma. Por tanto, la menor expresión de IGF-IIR tanto en embriones como en el tejido endometrial de la línea R, podrían dar lugar a mayores niveles séricos de IGF-II en estas hembras (Roberts *et al.*, 2008), lo que podría tener relación con los bajos niveles de estrógenos y de progesterona observados en las hembras de esta línea en el primer experimento, dado que los estrógenos regulan la producción de IGF-II y viceversa (Zollers *et al.*, 2001). De hecho, estos factores de crecimiento similares a insulina presentan diversas interacciones con la producción de progesterona, estradiol y sus receptores, aunque estas relaciones son todavía objeto de estudio. En la figura 22, se muestra un esquema de las interacciones conocidas hasta el momento entre IGF, IGFBP, estrógenos, progesterona y los receptores de todos ellos durante el proceso de implantación y placentación (Bowman *et al.*, 2010).

El estudio tanto de las bases moleculares como de las interacciones entre distintos factores que pueden dar lugar a pérdidas embrionarias y fetales debe ser abordado, por tanto, de un modo más amplio. Los estudios de expresión génica a gran escala son cada día más asequibles tanto por su coste como por las facilidades técnicas y el desarrollo de herramientas bioinformáticas, con lo que la utilización inicialmente de microarrays y, en breve, de la técnica de ultrasecuenciación de ARNm o microARN sobre embriones y tejidos endometrial y placentario podría esclarecer las causas o algunas de las causas de esta elevada mortalidad prenatal.

Figura 22. Modelo que ilustra las complejas interacciones entre hormonas y el eje IGF en las funciones placentarias. IGF: factor de crecimiento similar a insulina; IGFBP: proteína de unión a IGF; IGF-IR: receptor de IGF-I; PAPP-A: proteína plasmática A asociada a la gestación (adaptado de Bowman et al., 2010).



V. CONCLUSIONES

- La línea R, seleccionada por velocidad de crecimiento, presenta unas elevadas pérdidas gestacionales, que pueden ser constatadas ya en la segunda semana de gestación.
- Los bajos niveles de 17β -estradiol y, en consecuencia, los bajos niveles de progesterona a los 24 días en las hembras de la línea R podrían explicar, en parte, las mayores pérdidas gestacionales.
- El elevado nivel sérico de IGF-1 a los 12 días de gestación en las hembras de la línea R podría indicar una tasa metabólica elevada relacionada con problemas metabólicos, que afectarían a su capacidad reproductiva, característicos de líneas seleccionadas por masa corporal o bien, por velocidad de crecimiento.
- Las pérdidas hasta la implantación dependen tanto del genotipo embrionario como del materno, mientras que las pérdidas fetales son afectadas por el genotipo embrionario en las líneas estudiadas.
- El peso de la placenta fetal depende tanto del genotipo embrionario como del materno, mientras que el peso fetal es afectado por el genotipo embrionario.
- Los resultados de expresión génica relativa pueden variar según el modo de normalizarlos cuando se utilizan animales de diferente genotipo. Es recomendable realizar un estudio de estabilidad de los genes de referencia en ambos genotipos previo al estudio de esta expresión.
- Los embriones de conejo estabilizan la expresión de factores relacionados con la diferenciación celular, como el Oct4 en el quinto día de gestación, y aumentan la expresión de otros, relacionados con el proceso implantacional en el día 6.
- La línea R no presenta diferencias en los patrones de expresión de Oct4, VEGF, erbB3, TGF- β 2 e Ifn- γ respecto a la línea A a los 6 días de gestación.
- Los factores de crecimiento similares a la insulina IGF-I, IGF-II y el receptor IGF-IR muestran patrones similares tanto en embriones como en tejido endometrial en la línea R respecto a la línea A, mientras que la expresión relativa de IGF-IIR es menor en ambos casos. Debido a la implicación de este gen en diferentes síndromes relacionados con pérdidas gestacionales, podría ser un gen de estudio en la línea R.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aboagye-Mathiesen G, Tóth FD, Zdravkovic M, Ebbensen P, 1995. Human trophoblast interferons: production and possible roles in early pregnancy. *Early Pregnancy* 1, 41-53.
- Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, 2003. IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med* 349, 2211-2222.
- Adams CE, 1960. Studies on prenatal mortality in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): the amount and distribution of losses before and after implantation. *J Endocrinol* 19, 325-344.
- Adams CE, Chang MC, 1962. Capacitation of rabbit spermatozoa in the fallopian tube and in the uterus. *J Exp Zool* 5, 151-159.
- Agarwal SK, Vogel K, Weitsman SR, Magoffin DA, 1999. Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 1072-1076.
- Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O, Flannery ML, Kishnani NS, Hawkes SP, Werb Z, 1996. Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* 122, 1723-1736.
- Allen WR, 1992. The diagnosis and handling of early gestational abnormalities in the mare. *Anim Reprod Sci* 28, 31-38.
- Al-Murrani WK, Roberts RC, 1978. Maternal effects on body weight in mice selected for large and small size. *Genet Res Camb* 32, 295-302.
- Aplin J, Kimber S, 2004. Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reprod Biol Endocrinol* 5, 2-48.
- Argente MJ, Santacreu MA, Climent A, Bolet G, Blasco A, 1997. Divergent selection for uterine capacity in rabbits. *J Anim Sci* 75, 2350-2354.
- Argente MJ, Blasco A, Ortega JA, Haley CS, Visscher PM, 2003a. Analyses for the presence of a major gene affecting uterine capacity in unilaterally ovariectomized rabbits. *Genetics* 163, 1061-1068.
- Argente MJ, Santacreu MA, Climent A, Blasco A, 2003b. Relationships between uterine and fetal traits in rabbits selected on uterine capacity. *J Anim Sci* 81, 1265-1273.

- Arias-Álvarez M, García-García RM, Rebollar PG, Lorenzo PL, 2007. Desarrollo follicular en la coneja. ITEA 103, 173-185.
- Arias-Álvarez M, García-García RM, Rebollar PG, Nicodemus N, Revuelta L, Millán P, Lorenzo PL, 2009. Effects of a lignin-rich fibre diet on productive, reproductive and endocrine parameters in nulliparous rabbit does. *Livest Sci* 123, 107-115.
- Arias-Álvarez M, García-García RM, Torres-Rovira L, González-Bulnes A, Rebollar PG, Lorenzo PL, 2010. Influence of leptin on in vitro maturation and steroidogenic secretion of cumulus-oocyte complexes through JAK2/STAT3 and MEK1/2 pathways in the rabbit model. *Reproduction* 139, 523-532.
- Artini PG, Valentino V, Monteleone P, Simi G, Parisen-Toldi MR, Critello F, Cela V, Genazzani AR, 2008. Vascular Endothelial Growth Factor level changes during human embryo development in cultura medium. *Gyn Endocrinol* 24, 184-187.
- Ashton IK, Spencer EM, 1983. Effect of partially purified human somatomedin on human foetal and postnatal cartilage in vitro. *Early Hum Dev* 8, 135-140.
- Ashworth CJ, Haley CS, Aitken RP, Wilmut I, 1990. Embryo survival and conceptus growth after reciprocal embryo transfer between Chinese Meishan and Landrace x Large White gilts. *J Reprod Fertil* 90, 595-603.
- Babiarz B, Romagnano L, Kurilla G, 1992. The interaction of mouse ectoplacental cone trophoblast and uterine decidua in vitro. *In Vitro Cell Devel Biol* 8, 500-508.
- Battaglia RA, Meacham TN, 1969. Effect of chlorpropamide upon prenatal losses in rabbits. *Biol Reprod* 1, 289-294.
- Baselga M, Blasco A, 1989. Mejora genética del conejo de producción de carne. Ed. Mundi-Prensa Libros SA, Madrid.
- Bazer FW, Spencer TE, Ott TL, 1997. Interferon Tau: a novel pregnancy recognition signal. *Am J Reprod Immunol* 37, 412-420.
- Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Spencer TE, Wu G, 2008. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. *Reprod Biol* 8, 179-211.
- Beato M, 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335.

- Behrendtsen O, Alexander CM, Werb Z, 1992. Metalloproteínases mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowths. *Development* 114, 447-456.
- Blandau RJ, 1961. Young, WC (ed). Sex and internal secretion. Vol II. Williams and Wilkins, Baltimore, 797.
- Blasco A, Argente MJ, Haley CS, Santacreu MA, 1994. Relationships between components of litter size in unilaterally ovariectomized and intact rabbits does. *J Anim Sci* 72, 3066-3072.
- Biensen NJ, Wilson ME, Ford SP, 1998. The impact of either a Meishan or Yorkshire uterus on Meishan or Yorkshire fetal and placental development to days 70, 90 and 110 of gestation. *J Anim Sci* 76, 2169-2176.
- Boiti C, Guelfi G, Zampini D, Brecchia G, Gobbetti A, Zerani M, 2003. Regulation of nitric oxide synthase isoforms and role of nitric oxide during prostaglandin F2alpha-induced luteolysis in rabbits. *Reproduction* 125, 807-816.
- Boiti C, Guelfi G, Zerani M, Zampini D, Brecchia G, Gobbetti A, 2004. Expression patterns of cytokines, p53, and nitric oxide synthase isoenzymes in corpora lutea of pseudopregnant rabbits during spontaneous luteolysis. *Reproduction* 127, 229-238.
- Bolet G, Theau-Clément M, 1994. Fertilization rate and preimplantation embryonic development in two rabbit strains of different fecundity, in purebreeding and crossbreeding. *Anim Reprod Sci* 36, 153-162.
- Bowman CJ, Streck RD, Chapin RE, 2010. Maternal-placental insulin-like growth factor (IGF) signaling and its importance to normal embryo-fetal development. *Birth Defects Res (Part B)* 89, 339-349.
- Boyd JD, Hamilton WJ, 1952. Cleavage, early development and implantation of the egg. *Marshall's Physiology of Reproduction*. AS Parkes (ed). Longmans Green, New York.
- Boyer LA, Mathur D, Jaenisch R, 2006. Molecular control of pluripotency. *Curr Op Genet Dev* 16, 455-462.
- Böving, 1972. Spacing and orientation of blastocysts in utero. *Biology of mammalian fertilization and implantation*. Moghissi KS, Hafez ESE (eds). Charles C. Thomas publisher, 357-378.

- Brackett BG, Seitz HM, Rocha G, Mastroianni L, 1972. The mammalian fertilization process. In *Biology of mammalian fertilization and implantation*. Moghissi KS, Hafez ESE (eds). Charles C. Thomas publisher, 165-184.
- Bradford GE, 1979. Genetic variation in prenatal survival and litter size. *J Anim Sci* 49, 66-74.
- Brown N, Deb K, Paria BC, Das SK, Reese J, 2004. Embryo-Uterine interactions vis the neuregulin family of Growth Factors during implantation in the mouse. *Biol Reprod* 71, 2003-2011.
- Browning JY, Wolf RD, 1981. Maternal recognition of pregnancy in the rabbit: effect of conceptus removal. *Biol Reprod* 24, 293-297.
- Bruce NW, Abdul-Karim RW, 1973. Relationships between fetal weight, placental weight and maternal placental circulation in the rabbit at different stages of gestation. *J Reprod Fertil* 32, 15-24.
- Bünger L, Lewis RM, Rothschild MF, Blasco A, Renne U, Simm G, 2005. Relationships between quantitative and reproductive fitness traits in animals. *Phil Trans R Soc B* 360, 1489-1502.
- Butler WR, Smith RD, 1989. Interrelationship between energy balance and post partum reproductive function in dairy cattle. *J Dairy Sci* 72, 767-783.
- Camacho J, Baselga M, 1990. Estimation des correlations genetiques entre caracteres de reproduction et de croissance à travers la réponse à la sélection. *Proceedings of the 5èmes Journées de la Recherche Cunicule, Paris (France) ITAVI* 2, 1-9.
- Campbell S, Swann HR, Aplin JD, Richmond SJ, Haynes P, Allen TD, 1995. Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo. *Mol Human Reprod* 1, 1571-1576.
- Cervera C, Fernández-Carmona J, Viudes P, Blas E, 1993. Effect of remating interval and diet on the performance of female rabbits and their litters. *Anim Prod* 56, 399-405.
- Challis JRG, Davies IJ, Ryan KJ, 1974. The concentration of progesterone, estrona and 17 β -estradiol in the plasma of pregnant rabbit. *Endocrinology* 93, 971-976.
- 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 Interferon Res* 13, 313-322.

- Charpigny G, Reinaud P, Huet JC, Guillomot M, Chalier M, Pernollet JC, Martal J, 1998. High homology between a trophoblastic protein (trophoblastin) isolated from ovine embryo and α -interferons. *Febs Letters* 228, 12-16.
- Chi MM, Schlein AL, Moley KH, 2000. High insulin-like growth factor 1 (IGF-1 and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. *Endocrinology* 141, 4784-4792.
- Chun SY, Eisenhauer KM, Kubo M, Hsueh AJ, 1995. Interleukin-1 beta suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. *Endocrinology* 136, 3120-3127.
- Clemmons DR, Maile LA, 2005. Interaction between insulin-like growth factor-I receptor and alphaVbeta 3 integrin linked signaling pathways: cellular responses to changes in multiple signaling inputs. *Mol Endocrinol* 19, 1-11.
- Craig AM, Denhardt DT, 1991. The murine gene encoding secreted phosphoprotein 1 (OPN, osteopontina): Promoter structure, activity, and induction in vivo by estrogen and progesterone. *Gene* 100, 163-171.
- Cross JC, Roberts RM, 1989. Porcine conceptuses secrete an interferon during the preattachment period of early pregnancy. *Biol Reprod* 40, 1109-1399.
- Czech MP, 1989. Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell* 59, 235-238.
- Datzer V, Leiser R, Kaufmann P, Luckhardt M, 1988. Comparative morphological aspects of placental vascularization. *Trophoblast Res* 3, 235-260.
- Davidson JM, 1969. *Frontiers in Neuroendocrinology*. Ganong WF y Martini L (eds). Oxford Univ Press 343-388.
- DelaSota RL, Burke JM, Risco CA, Moreira F, DeLorenzo MA, Thatcher WW, 1998. Evaluation of timing insemination during summer heat stress in lactating dairy cattle. *Theriogenology* 49, 761-770.
- De Maeyer E, De Maeyer-Guignard J, 1988. Interferon gamma. *Curr Opin Immunol* 4, 321-326.
- Denker HW, 2000. Structural dynamics and function of early embryonic coats. *Cell Tissues Organs* 166, 180-207.

- Denley AQ, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE, 2005. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 421-439.
- Dobson H, Smith RF, 1995. Stress and reproduction in farm animals. *J Reprod Fertil* 49, 451-461.
- Dode MA, Dufort I, Massicotte L, Sirard MA, 2006. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. *Mol Reprod Dev* 73, 288-297.
- Duc-Goiran P, Mignot TM, Bourgeois C, Ferré F, 1999. Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 83, 85-100.
- Dugré FJ, Lambert RD, Bélanger A, Fortier MA, Caron S, 1989. Local effect of the rabbit embryo-fetus on uterine progesterone and pregnenolone levels. *Mol Cell Endocrinol* 64, 251-255.
- Dziuk PJ, 1992. Embryonic development and fetal growth. *Anim Reprod Sci* 28, 299.
- Ebling FJP, Foster DL, 1991. Growth, nutrition and the neuroendocrine control of puberty in female sheep. *Proceedings of the 101st British Society of Animal Production, Scarborough (United Kingdom) 18-20 March, Anim Prod vol. 52, 568-569.*
- Enkhuizen PJM van, 1980: Distribution in size and number of ovarian follicles in the pregnant rabbit before and after reovulation with hCG. *Proceedings of the Twelfth annual Conference of Australian Society for Reproductive Biology. University of New England.*
- Eckert, 1998. *Animal Physiology. McGraw-Hill Interamericana (Ed).*
- Eggenschwiler J, Ludwig T, Fisher P, Leighton PA, Tilghman SM, Efstratiadis A, 1997. Mouse mutant embryos overexpression IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith-Wiedemann and Simpson-Golabi-Behmel syndromes. *Genes Dev* 11, 3128-3142.
- 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 Reprod Fertil* 118, 205-210.

- Estany J, Baselga M, Blasco A, Camacho J, 1989. Mixed model methodology for the estimation of genetic response to selection in litter size of rabbit. *Livest Prod Sci* 1, 67-76.
- 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.
- Estellé J, Sastre Y, Merchán M, Peiró R, Santacreu MA, Folch JM, 2006. TIMP-1 as candidate gene for embryo survival in two divergent lines selected for uterine capacity in rabbits. *Mol Reprod Dev* 73, 678-684.
- Evans PW, Wheeler T, Anthony FW, Osmond C, 1998. A longitudinal study of maternal serum vascular endothelial growth factor in early pregnancy. *Human Reprod* 13, 1057-1062.
- Fair T, Murphy M, Rizos D, Moss C, Martin F, Boland MP, Lonergan P, 2004. Analysis of differential maternal mRNA expression in developmentally competent and incompetent bovine two-cell embryos. *Mol Reprod Dev* 67, 136-144.
- Fant M, Munro H, Moses AC, 1986. An autocrine/paracrine role for insulin-like growth factors in the regulation of human placental growth. *J Clin Endocrinol Metab* 63, 499-505.
- 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.
- Fink R, Tauson AH, Forsberg M, 1998. Influence of different planes of energy supply prior to the breeding season on blood metabolites in female mink (*Mustela vison*). *Reprod Nutr Dev* 38, 107-116.
- Finn FM, Hofmann K, 1990. Isolation and characterization of hormone receptors. *Methods Enzymol* 184, 244-274.
- Ford SP, Vonnahme KA, Wilson ME, 2002. Uterine capacity in the pig reflects a combination of uterine environment and conceptus genotype effects. *J Anim Sci* 80, E66-E73.
- Fortun-Lamothe L, Bolet G, 1995. Les effects de la lactation sur les performances de reproduction chez la lapine. *INRA Prod Anim* 8, 49-56.

- Fortun-Lamothe L, 1998. Effect of re-mating energy intake on reproductive performance of rabbit does. *Anim Reprod Sci* 37, 75-84.
- 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.
- Fortun-Lamothe L, 2006. Energy balance and reproductive performance in rabbit does. *Anim Repr Sci* 93, 1-15.
- Foxcroft GR, Dixon WT, Novak S, Putman CT, Town SC, Vinsky MDA, 2006. The biological basis for prenatal programming of postnatal performance in pigs. *J Anim Sci* 84, 105-112.
- 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.
- Funk CR, DeMayo FJ, 1998. The role of progesterone in the uterus. *Encyclopedia of Reproduction*. Knobil E, Neil JD (eds). San Diego: Academic Press.
- Gadsby JE, Keyes PL, Bill CH, 1983. Control of corpus luteum function in the pregnant rabbit: role of estrogen and lack of a direct luteotropic role of the placenta. *Endocrinology* 113, 2255-2262.
- Gadsby JE, Keyes L, 1984. Control of corpus luteum function in the pregnancy rabbit: role of the placenta ("placental luteotropin") in regulating responsiveness of corpora lutea to estrogen. *Biol Reprod* 31, 16-24.
- Galán A, O'Connor J, Valbuena D, Herrero R, Remohí J, Pampfer S, Pellicer A, Simón C, 2000. The human blastocyst regulates endometrial epithelial apoptosis in embryonic adhesion. *Biol Reprod* 63, 430-439.
- García-Ximénez F, 1991. *Biología de la reproducción en la hembra del conejo doméstico*. Universidad Politécnica de Valencia, SPUPV-91.643.
- Garreau H, Szendro ZS, Larzul C, Rochambeau de H, 2000. Genetic parameters and genetic trends of growth and litter size traits in the White Pannon breed. *Proceedings of the 7th World Rabbit Congress, Valencia (Spain)* 403-408.

- Germain-Lee L, Janicot M, Lammers R, Ullrich A, Casella SJ, 1992. Expression of a type I insulin-like growth factor receptor with low affinity for insulin-like growth factor II. *Biochem J* 281, 413-417.
- Gleeson LM, Chakraborty C, McKinnon T, Lala PK, 2001. Insulin-like growth factor binding protein-1 stimulates human trophoblast migration by signaling through $\alpha 5\beta 1$ integrin via MAPK pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2484-2493.
- Ginther OJ, 1989. Twin embryos in mares II: post fixation embryo reduction. *Equine Vet J* 21, 171-174.
- Giordano A, Tonello C, Bulbarelli A, Cozzi V, Cinti S, Carruba MO, 2002. Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus. *Febs Lett* 514, 135-140.
- Giudice LC, 1998. The roles of IGFs and IGFBP-1 in non-pregnant human endometrium and at the maternal: placental interface during human pregnancy. *Molecular Mechanisms to Regulate the Activities of Insulin-like Growth Factors*, 195-203. Takano K, Hizuna N, Takahashi SI (eds). Amsterdam: Elsevier Science.
- Gobbetti A, Boiti C, Canali C, Zerani M, 1999. Nitric oxide synthase acutely regulates progesterone production by *in vitro* cultured rabbit corpora lutea. *J Endocrinol* 160, 275-283.
- 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.
- Gómez EA, Rafel O, Ramon J, 1998. Genetic relationship between growth and litter size traits at first parity in a specialized dam line. *Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Amidale (Australia)* 552-555.
- Gómez EA, Baselga M, Rafel O, García ML, Ramón J, 1999. Selection, diffusion and performances of six Spanish lines of meat rabbit. *Cahiers Options Méditerranéennes* 41, 147-152.
- Graham TW, Giri SN, Daels PF, Cullor JS, Keen CL, Thurmond MC, Dellinger JD, Stabenfeldt HH, Osburn BI, 1995. Associations among prostaglandins F2alpha, plasma zinc, copper and iron concentrations and fetal loss in cows and mares. *Theriogenology* 44, 379-390.

- Grosser O, 1909. Vergleichende Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Eihäute und der Placenta. W. Braumüller, Vienna.
- Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, 2004. Definition of the metabolic syndrome: report of the National Heart Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 109, 433-438.
- Guinec N, Dalet-Fumeron V, Pagano M, 1993. In vitro study of basement membrane degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B, B-like and L. *Biol Chem Hoopseyler* 374, 1135-1146.
- Hadley ME, 1997. *Endocrinology*. Prentice Hall International (ed). UK.
- Hafez ESE, Ishibashi I, 1965: Effect of lactation and age at first breeding on size and survival of rabbit blastocysts. *Int J Fertil* 10, 47-55.
- Hafez ESE, Tsutsumi T, 1966. Changes in endometrial vascularity during implantation and pregnancy in the rabbit. *Am J Anat* 118, 249.
- Hamilton H, Lukefahr SD, McNitt JI, 1997. Maternal nest quality and its influence on litter survival and weaning performance in commercial rabbits. *J Anim Sci* 75, 926-933.
- Han VKM, 1996. The ontogeny of growth hormone, insulin-like growth factors and sex steroids: molecular aspects. *Horm Res* 45, 61-66.
- 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.
- Harper MJK, 1961. The time of ovulation in the rabbit following the injection of Luteinizing Hormone. *J Endocrinol* 22, 147.
- Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Edwards DR, Schultz GA, 1995. Roles of growth factors during peri-implantation development. *Mol Hum Reprod* 10, 712-718.
- Herr F, Liang OD, Herrero J, Lang U, Preissner KT, Han VKM, Zygmunt MZ, 2003. Possible angiogenic roles of insulin-like growth factor II and its receptors in uterine vascular adaptation to pregnancy. *J Clin Endocrinol Met* 88, 4811-4817.
- Hetherington CM, 1971. The decidual cell reaction, placental weight, foetal weight and placental morphology in the mouse. *J Reprod Fertil* 25, 417.

- Hilliard J, Scaramuzzi RJ, Penardi R, Sawyer CH, 1973. Prolactin, estradiol and progesterone levels in ovarian venous blood of pregnant rabbits. *Endocrinology* 93, 1235.
- Hoffman LH, Olson GE, Carson DD, Chilton BS, 1998. P4 and implanting blastocysts regulate Muc1 expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinology* 139, 266-271.
- Holt JA, 1989. Regulation of progesterone production in the rabbit corpus luteum. *Biol Reprod* 40, 201-208.
- Huang HF, Wang B, Yang XF, Luo Q, Sheng JZ, 2005. Nitric oxide mediates inhibitory effect of leptin on insulin-like growth factor I augmentation of 17 β -estradiol production in human granulosa cells. *Biol Reprod* 72, 102-106.
- Illera MJ, Lorenzo PL, Gui Y, Beyler SA, Apparao KBC, Lessey BA, 2003. A role for α V β 3 integrin during implantation in the rabbit model. *Biol Reprod Fertil* 95, 409-420.
- Imakawa K, Anthony RV, Kazemi M, Marotti KR, Polites HG, Roberts RM, 1987. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophoblast. *Nature* 330, 377-379.
- Irving JA, Lysiak JJ, Graham CH, Han VKM, Hearn S, Lala PK, 1995. Characteristics of trophoblast cells migration from first trimester chorionic villi explants and propagated in culture. *Placenta* 16, 413-433.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinardt 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.
- Johnson DC, Chatterjee S, 1993. Embryo implantation in the rat uterus induced by epidermal growth factor. *J Reprod Fertil* 99, 557-559.
- Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW, Spencer TE, 2003. Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biol Reprod* 69, 1458-1471.
- Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA, 2006. TGF- β superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction* 132, 217-232.

- Katagiri S, Moon YS, Yuen BH, 1997. A somatostatin analogue decreases embryonic loss following superovulation in rats by normalizing insulin-like growth factor-I action in the uterus. *Hum Reprod* 12, 671-676.
- 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). *Inf Immun* 60, 933-936.
- Khan-Dawood FS, Yusoff-Dswood M, 1984. Implantation of the rabbit blastocyst: sequential changes in estradiol and progesterone and their receptors. *Am J Obstet Gynecol* 150, 450-455.
- Khiredine B, Grimard B, Ponter AA, Ponsart C, Boudjenah H, Mialot JP, Sauvart D, Humblot P, 1998. Influence of flushing on LH secretion, follicular growth and the response to estrus synchronization treatment in suckled beef cows. *Theriogenology* 49, 1409-1423.
- Kitamura T, Kahn CR, Accili D, 2003. Insulin receptor knockout mice. *An Rev Physiol* 65, 313-332.
- Klindt J, Maurer RR, 1986. Reciprocal cross effects on growth hormone and prolactin secretion in cattle: influence of genotype and maternal environment. *J Anim Sci* 62, 1660-1665.
- Kniss DA, Shubert PJ, Zimmermann PD, Landon MB, Gabbe SG, 1994. Insulin-like growth factors. Their regulation of glucose and amino acid transport in placental trophoblasts isolated from first-trimester chorionic villi. *J Biol Chem* 258, 6561-6556.
- Kobolak J, Kiss K, Polgar Z, Mamo S, Rogel-Gaillard C, Tancos Z, Bock I, Baji AG, Tar K, Purity MK, Dinnyes A, 2009. Promoter analysis of the rabbit POU5F1 gene and its expression in preimplantation stage embryos. *BMC Mol Biol* 10, 88-100.
- Lah TT, Buck MR, Honn KV, Crissman JD, Rao NC, Liotta AL, 1989. Degradation of laminin by human tumor cathepsin B. *Clin Exp Metastasis* 7, 461-469.
- Lau IF, Saksena SK, Salmons R, 1982. The concentration of progesterone, 20-dihydroprogesterone, testosterone, oestrone and oestradiol-17B in serum, amniotic fluid and placental tissue of pregnant rabbits. *Acta Endocrinol* 99, 605-611.

- Lau MM, Stewart CE, Liu Z, Bhatt H, Rotwein P, Stewart CL, 1994. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Dev* 8, 2953-2963.
- Lavara R, Vicente JS, Marco-Jiménez F, Baselga M, 2008. Correlation between casa and asma parameters in Rabbit semen. *Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, Verona (Italy)* 381-386.
- Lavara R, Vicente JS, Baselga M, 2011. Genetic parameter estimates for semen production traits and growth rate of a paternal rabbit line. *J Anim Breed Genet* 128, 44-51.
- Lazzari G, Colleoni S, Duchi R, Galli A, Houghton FD, Galli D, 2011. Embryonic genotype and inbreeding affect preimplantation development in cattle. *Reproduction* 141, 625-632.
- Lefèvre B, Caillol M, 1978. Relationship of estrous behavior with follicular growth and sex steroid concentration in the follicular fluid in the domestic rabbit. *Ann Biol Bioch Biophys* 18, 1435-1441.
- Lefèvre F, Boulay V, 1990. A novel and atypical type one interferon gene expressed by trophoblast during early pregnancy. *J Biol Chem* 268, 19760-19768.
- 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, 67-74.
- Li Y, Geng YJ, 2010. A potential role for insulin-like growth factor signaling in induction of pluripotent stem cell formation. *Exp Cell Res* 316, 3435-3442.
- Lin KC, Kawamura N, Okamura H, Mori T, 1988. Inhibition of ovulation, steroidogenesis and collagenolytic activity in rabbits by sulphiride-induced hyperprolactinaemia. *J Reprod Fertil* 83, 611-618.
- Linnemeyer PA, Pollack SB, 1993. Murine granulated metrial gland cells at uterine implantation sites are natural killer lineage cells. *J Immunol* 147, 2530-2535.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A, 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type I IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75, 59-72.

- Liu L, Leaman DW, Villalta M, Roberts RM, 1997. Silencing of the gene for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin by the embryonic transcription factor Oct-3/4. *Mol Endocrinol* 11, 1651–1658.
- Maertens L, Okerman F, 1988. Le rythme de reproduction intensif en cuniculture. *Cuniculture* 82, 171-177.
- Maertens L, 1998. Effect of flushing, mother-litter separation and PMSG on the fertility of lactating does and the performance of their litter. *World Rabbit Sci* 6, 185-190.
- Mamo S, Gal AB, Bodo S, Dinnyes A, 2007. Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro. *BMC Dev Biol* 714.
- 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.
- Masuda M, Kubota T, Karnada S, Aso T, 1997. Nitric oxide inhibits steroidogenesis in cultured porcine granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 3, 285-292.
- Matsumi H, Koji T, Yano T, Yano N, Tsutsumi O, Momoeda M, Osuga Y, Taketani Y, 1998. Evidence for an inverse relationship between apoptosis a possible role of nitric oxide in ovarian follicle atresia. *Endocrinol J* 45, 745-751.
- McNeilly AS, Friesen HG, 1978. Prolactin during pregnancy and lactation in the rabbit. *Endocrinology* 102, 1548-1554.
- Mgheni M, Christensen K, 1985. Selection experiment on growth and litter size in rabbits. II. Two-way selection response for body weight at 112 days. *Acta Agric Scand* 35, 278-286.
- Miller JB, Keyes PL, 1978. Transition of the rabbit corpus luteum to estrogen dependence during early luteal development. *Endocrinology* 102, 31-38.
- Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL, Norman RJ, 2005. Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction* 130, 583-597.
- Mocé ML, Santacreu MA, Climent A, 2002. Effect of divergent selection for uterine capacity on progesterone, estradiol and cholesterol levels around implantation time in rabbit. *World Rabbit Sci* 10, 89-97.

- 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.
- Munsel Von M, Elsaesser F, Paufler S, 1982. Endocrinological investigation of the peripartum period and the puerperium in rabbits. *Zychthygiene* 17, 165-171.
- Murrell A, Heeson S Cooper WN, Douglas E, Apostolidou S, Moore GE, Maher ER, Reik W, 2004. An association between variants in the IGF2 gene and Beckwith-Wiedemann syndrome: interaction between genotype and epigenotype. *Hum Mol Genet* 13, 247-255.
- 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.
- Navarrete-Santos A, Ramin N, Tonack S, Fischer B, 2008. Cell lineage-specific signaling of insulin and insulin-like growth factor I in rabbits blastocysts. *Endocrinology* 149, 515-524.
- 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.
- Niemann H, Freitag M, Elseasser F, 1989. The role of oestrogens in early embryonic development. *J Reprod Fertil Suppl.* 38, 73-83.
- Nicodemus N, Carabaño R, García J, Méndez J, De Blas C, 1999. Performance response of lactating and growing rabbits to dietary lignin content. *Anim Fedd Sci Technol* 80, 43-54.
- Nisoli E, Clementi E, Paolucci CE, Cozzil V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO, 2003. Mitochondrial biogenesis in mammals. The role of endogenous nitric oxide. *Science* 5608, 896-899.
- O'Dell SD, Day IN, 1998. Insulin-like growth factor II (IGF-II). *Int J Biochem Cell Biol* 30, 767-771.
- Nizza A, Di Meo C, Esposito L, 1997. Influence of the diet used before and after the first mating on reproductive performance of rabbit does. *World Rabbit Sci* 5, 107-110.

- Oliphant G, Cabot C, Ross P, Martha J, 1984. Control of the humoral immune system within the rabbit oviduct. *Biol Reprod* 31, 205-212.
- Orgebin-Cristh MC, 1967. Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis: fertilizing ability and embryonic mortality in does inseminated with epididymal spermatozoa. *Ann Biol Anim Biochem Biophys* 7, 373.
- Orstead KM, Hess DL, Spies HG, 1988. Pulsatile patterns of gonadotropins and ovarian steroids during estrus and pseudopregnancy in the rabbit. *Biol Reprod* 38, 733-743.
- 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.
- Parigi-Bini R, Xiccato G, Cinetto M, 1990. Energy and protein retention and partition in rabbit does during first pregnancy. *Cuni Sci* 6, 19-29.
- Pascual JJ, 2001. Early weaning of young rabbits: a review. *World Rabbit Sci.* 9, 165-170.
- Pascual JJ, Cervera C, Fernández-Carmona J, 2002. A feeding programme for young rabbit does based on Lucerne. *World Rabbit Sci* 10, 7-14.
- Pascual JJ, Cervera C, Blas E, Fernández-Carmona J, 2003. High-energy diets for reproductive rabbit does: effect of energy source. *Nutr Abstr Rev* 73, 27-39.
- Pauken CM, Capco DG, 1999. Regulation of cell adhesion during embryonic compactation of mammalian embryos: roles for PKC and β -catenin. *Mol Reprod Dev* 54, 135-144.
- Peiró R, Santacreu MA, Climent A, Blasco A, 2007. Early embryonic survival and embryo development in two lines of rabbits divergently selected for uterine capacity. *J Anim Sci* 85, 1634-1639.
- Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Schöler H, 1998. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mec Develop* 71, 89-98.
- Pinto AB, Schlein AL, Moley KH, 2002. Preimplantation exposure to high insulin-like growth factor I concentrations results in increased resorptions rates in vivo. *Hum Reprod* 17, 457-462.

- Pitt JA, Carney EW, 1999. Development and morphologically-based scoring system for postimplantation New Zealand White rabbit embryos. *Teratology* 59, 88-101.
- Pomp D, Cowley DE, Eisen EJ, Atchley WR, Hawkings-Brown D, 1989. Donor and recipient genotype and heterosis effects on survival and prenatal growth of transferred mouse embryos. *J Reprod Fertil* 86, 493-500.
- Powell K, Rooke JA, McEvory TG, Ashworth CJ, Robinson JJ, Wilmot I, Young LE, Sinclair KD, 2006. Zygote donor nitrogen metabolism and in vitro embryo culture perturbs in utero development and *IGF2R* expression in ovine fetal tissues. *Theriogenology* 66, 1901-1912.
- 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, 1273-1278.
- Pringle KG, Roberts CT, 2007. New light on early post-implantation pregnancy in the mouse: roles for insulin-like growth factor-II (IGF-II). *Placenta* 28, 286-297.
- Puente XS, Sánchez LM, Gutiérrez-Fernández A, Velasco G, López-Otín C, 2005. A genomic view of complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochem Soc Trans* 33, 331-334.
- Ramin N, Thieme R, Fischer S, Schindler M, Schmidt T, Fischer B, Navarrete-Santos A, 2010. Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts. *Endocrinology* 151, 4158-4167.
- Rebollar PG, Milanés A, Pereda N, Millán P, Cano P, Esquifino AI, Villaroel M, Silván G, Lorenzo PL, 2006. Oestrus synchronisation of rabbit does at early post-partum by doe-litter separation or ECG injection: reproductive parameters and endocrine profiles. *Anim Repr Sci* 93, 218-230.
- Rebollar PG, Bonanno A, Di Grigoli A, Tornambè G, Lorenzo PL, 2008. Endocrine and ovarian response after a 2-day controlled suckling and eCG treatment in lactating rabbit does. *Anim Reprod Sci* 104, 316-328.
- Rebollar PG, Pérez-Cabal MA, Pereda N, Lorenzo PL, Árias-Álvarez M, García-Rebollar PG, 2009. Effects of parity order and reproductive management on the efficiency of rabbit productive systems. *Livest Sci* 121, 227-233.

- Reik W, Maher ER, 1997. Imprinting in clusters: lessons from Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet* 13, 330-334.
- Rinderknecht E, Humbel RE, 1978. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253, 2769-2776.
- Ritvos O, Ranta T, Jalkanen J, Suikkari AM, Voutilainen R, Bohn H, Rutanen EM, 1988. Insulin growth factor (IGF) binding protein from human decidua inhibits the binding and biological action of IGF-I in cultured choriocarcinoma cells. *Endocrinology* 122, 2150-2157.
- Roberts RM, Ezashi T, Das P, 2004. Trophoblast gene expression: transcription factors in the specification of early trophoblast. *Reprod Biol Endocrinol* 2, 1-9.
- Roberts CT, Owens JA, Sferruzi-Perri AN, 2008. Distinct actions of insulin-like growth factors (IGFs) on placental development and fetal growth: lessons from mice and guinea pigs. *Placenta* 29, Supp A, Trophoblast Res 22, S42-S47.
- Rochambeau H de, Fuente LF de la, Rouvier R, Ouhayoun J, 1989. Sélection sur la vitesse de croissance post-sevrage chez le lapin. *Genet Sel Evol* 21, 527-546.
- Rogers J, Wiltrout L, Nanu L, Fant ME, 1996. Developmentally regulated expression of IGF binding protein-3 (IGFBP-3) in human placental fibroblasts: effect of exogenous IGFBP-3 on IGF-I action. *Regul Pept* 61, 189-195.
- 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, 1103-1110.
- 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.
- Schencke C, Rojas M, Del Sol M, 2008. Morphometric evaluation of the embryo-uterine relationship of the pre and post implantational stages in rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Int J Morphol* 26, 995-1004.
- 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.

- Schöler HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P, 1990. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct4. *Nature* 344, 435-439.
- Seitz HM, Rocha G, Brackett BG, Mastroianni L, 1970. Influence of the oviduct on sperm capacitation in the rabbit. *Fertil Steril* 21, 325-328.
- Sferruzzi-Perri AN, Owens JA, Pringle KG, Robinson JS, Roberts CT, 2006. Maternal insulin-like growth factors-I and -II act via different pathways to promote fetal growth. *Endocrinology* 147, 3344-3355.
- Sferruzzi-Perri AN, Owens JA, Standen P, Taylor RL, Robinson JS, Roberts CT, 2007. Early pregnancy maternal endocrine insulin-like growth factor I programs the placenta for increased functional capacity throughout gestation. *Endocrinology* 148, 4362-4370.
- Shaikh AA, Harper MJK, 1972. Ovarian steroid secretion in estrous, mated and hCG-treated rabbits, determined by concurrent cannulation of both ovarian veins. *Biol Reprod* 7, 387-397.
- Sharkey A, 1998. Cytokines and implantation. *Rev Reprod* 3, 52-61.
- Shen L, Tso P, Woods SC, Sakai RR, Davidson S, Liu M, 2007. Hypotalamic apolipoprotein A-IV is regulated by leptin. *Endocrinology* 148, 2681-2689.
- 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, 231-242.
- Soupart P, 1972. Sperm capacitation: methodology, hormonal control and the search for a mechanism. *Biology of mammalian fertilization and implantation*. Moghissi KS, Hafez ESE (eds). Charles C. Thomas publisher, 54-125.
- Spies HG, Francis Pau KY, Yang SP, 1997. Coital and estrogen signals: a contrast in the preovulatory neuroendocrine networks of rabbits and rhesus monkeys. *Biol Reprod* 56, 310-319.
- Spilman CH, Larson LL, Concannon PW, Foote RM, 1972. Ovarian function during pregnancy in young and aged rabbits: temporal relationship between fetal death and corpus luteum regression. *Biol Reprod* 7, 223-230.
- Staun-Ram E, Shalev E, 2005. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol* 3, 56-68.

- Strahl H, 1905. Beiträge zur vergleichenden Anatomie der Placenta. Abh Senckenb Naturf Ges 27, 263-319.
- Surveyor GA, Gedle SJ, Pemberton L, Das SK, Chakraborty I, Julian J, Pimental RA, Wegner CC, Dey SK, Carson DD, 1995. Expression and steroid hormonal control of Muc1 in the mouse uterus. *Endocrinology* 136, 3639-3647.
- Takeishi M, Kamemizu H, Sugawa A, 1963. Morphological observations on implantation of the fertilized ovum in the rabbit. *Bull Coll Agric Nihon Univ* 16, 19-27.
- 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.
- Tao T, Niemann H, 2000. Cellular characterization of blastocysts derived from rabbit 4-, 8- and isolated blastomeres cultured in vitro. *Human Reprod* 15, 881-889.
- Thibault C, 1975. La fécondité et stérilité du femelle. Masson (ed). Paris.
- Torres S, Hulot F, Sevellec C, 1987. Early stages of embryonic development in two rabbits genotypes. *Reprod Nutr Dev* 27, 715-719.
- Tsampalas M, Gridelet V, Berndt S, Foidart JM, Geenen V, d'Hauterive SP, 2010. Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *J Reprod Immunol* 85, 93-98.
- Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E, 1986. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 5, 2503-2512.
- Valdés G, Erices R, Chacón C, Corthorn A, 2008. Angiogenic, hypermeability and vasodilator network in utero-placental units along pregnancy in the guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Reprod Biol Endocrinol* 6, 13-24.
- Van Voorhis BJ, Dunn MS, Snyder GD, Weiner CP, 1994. Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. *Endocrinology* 135, 1799-1806.

- Viard F, Provot F, 1988. Plasma progesterone levels in pregnant doe rabbits: relation with pathology observed in maternity ward. Proceedings of the 4th Congress of the World Rabbit Science Association. Vol.I, Budapest.
- Volpert O, Jackson D, Bouck N, Linzer DIH, 1996. The insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor is required for proliferin-induced angiogenesis. *Endocrinology* 137, 3871-3876.
- Wang DY, Young S, Bulbrook RD, 1966. The distribution of (1,2-3H)testosterone in the tissues of female rats. *J Endocrinol* 34, 491-496.
- Wang C, Campos RV, Stobie KM, Brubaker PL, Drucker DJ, 1991. Differential glucocorticoid regulation of glucagon gene expression in cells lines derived from rat and hamster islet cell tumors. *Cancer Res* 51, 1196-1201.
- Wang ZQ, Fung ME, Barlow DP, Wagner EF, 1994. Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted *igf2/Mpr* gene. *Nature* 372, 464-467.
- Westwood M, Gibson JM, Davies AJ, Young RJ, White A, 1994. The phosphorylation pattern of insulin-like growth factor-binding protein-1 in normal plasma is different from that in amniotic fluid and changes during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 79, 1735-1741.
- Wilmut I, Sales DI, Ashworth E, 1986. Maternal and embryonic factors associated with prenatal loss in mammals. *J Reprod Fert* 76, 851-864.
- Wilson DM, Bennett A, Adamson GD, Nagashima RJ, Liu F, DeNatale ML, Hintz RL, Rosenfeld RG, 1982. Somatomedins in pregnancy: a cross-sectional study of insulin-like growth factors I and II and somatomedin peptide content in normal human pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 55, 858-861.
- 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.
- Wise T, Heap RB, 1983. Effects of the embryo upon endometrial estrogen synthesis in the rabbit. *Biol Reprod* 28, 1097-1106.
- Wu JT, Williams KJH, 1986. Metabolism of estrogen by rabbit blastocysts in culture. *Biol Reprod* 34, 104.

Xiccato G, Benardini M, Castellini C, Dalle Zotte A, Queaque PI, Trocino A, 1999. Effect of postweaning feeding on the performance and energy balance of female rabbits at different physiological state. *J Anim Sci* 77, 416-426.

Xiccato G, Trocino A, Sartori A, Quaque PI, 2004. Effect of doe parity order and litter weaning age on the performance and body energy deficit of rabbit does. *Livestock Prod Sci* 85, 239-251.

Xiccato G, Trocino A, Boiti C, Brecchia G, 2005. Reproductive rhythm and litter weaning age as they affect rabbit doe performance and body energy balance. *Anim Sci* 81, 289-296.

Yamauchi J, Miyazaki T, Iwasaki S, Kishi I, Kuroshima M, Tei C, Yoshimura Y, 1997. Effects of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prostaglandin production in the rabbit. *Endocrinology* 138, 3630-3637.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM, 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.

Zoldag L, Gabor GY, Molnar L, Solti L, 1988. Progesterone concentrations of new Zealand rabbits in varied reproductive phases. *Proceedings of the 4th Congress of the World rabbit Science Association Vol.I, Budapest.*

Zollers Jr WG, Babischkin JS, Pepe GJ, Albrecht ED, 2001. Developmental regulation of placental insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein-1 and -2 messenger RNA expression during primate pregnancy. *Biol Reprod* 65, 1208-1212.

