

# EFECTO DE MEDIANO PLAZO DE LA NUTRICIÓN SOBRE PARÁMETROS ENDÓCRINOS Y LA EXPRESIÓN DE GENES DEL EJE SOMATOTRÓFICO EN ENDOMETRIO E HÍGADO EN VAQUILLONAS HEREFORD

D. Guggeri<sup>1</sup>, A. Meikle<sup>2</sup>, M. Carriquiry<sup>3</sup>,  
F. Montossi<sup>1</sup>, I. De Barbieri<sup>1</sup>, C. Viñoles<sup>1</sup>

## RESUMEN

Se evaluó el efecto de mediano plazo de distintos manejos aplicados a edad temprana sobre parámetros endocrinos y expresión de genes del eje somatotrófico en hígado y endometrio en vaquillonas Hereford pastoreando campo natural. Las vaquillonas recibieron tres tratamientos: 1) destete precoz (n=8) a los 75±1,5 días de edad (DP), 2) destete tradicional a los 158±1,5 días de edad (DTr) y 3) destete tradicional con creep feeding (CF) desde los 75±1,5 a 158±1,5 días de edad (DTr+CF). A los 709±1,5 días (edad del primer servicio) las vaquillonas fueron sincronizadas con prostaglandina con un intervalo de 11 días, se detectó celo (Día 0), y se siguió el primer ciclo estral hasta el día 16, momento en el que se resincronizaron y se siguieron hasta el día 7 del segundo ciclo estral. Se realizó sangrado diario durante ambos ciclos estrales y biopsias hepáticas y uterinas los días 7 y 16. Al día 7 las vaquillonas del grupo DTr+CF expresaron más receptores para hormona de crecimiento en hígado que las del grupo DTr (P=0,05) y mayores concentraciones de transcripto de la proteína de unión 3 de IGF (IGFBP-3), que las de los grupos DTr y DP (P < 0,05). El endometrio de las vaquillonas del grupo DTr+CF tendió (P=0,1) a tener una mayor expresión del transcripto de IGF-I en el día 7 comparado con las del grupo de DP, y en el día 16 se encontraron mayores concentraciones del transcripto de IGF-II en las vaquillonas del grupo DTr+CF comparado con las de los grupos DTr y DP (P < 0,05). Las concentraciones de leptina e IGF-I fueron similares entre grupos, pero las concentraciones de progesterona fueron mayores (P < 0,02) los días 15 y 16 del ciclo estral en las vaquillonas del grupo DTr+CF respecto a las de los grupos DP y DTr. Concluimos que el CF en terneras pastoreando campo natural, tiene un efecto a mediano plazo en el funcionamiento del eje somatotrófico en hígado y endometrio, con un potencial de efecto positivo en la eficiencia reproductiva del rodeo.

45

<sup>1</sup> INIA, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria.

<sup>2</sup> Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria.

<sup>3</sup> Producción Animal y de Pasturas, Facultad de Agronomía.

## INTRODUCCIÓN

Un incremento en el plano nutricional a temprana edad está asociado positivamente con un estado metabólico que estimula el crecimiento (Hopper *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1995) y adelanta la edad a la pubertad (Wiltbank *et al.*, 1966). El creep feeding y el destete precoz con dietas altas en energía son estrategias de manejo que permiten lograr estos objetivos (Gasser, 2013; Guggeri *et al.*, 2014). Corderas alimentadas en un alto plano nutricional antes del destete producen más corderos en su edad adulta comparadas con corderas alimentadas con dietas restrictivas (Rhind *et al.*, 1998), resultado que está probablemente asociado a un mayor sobrevivencia embrionaria (Gunn *et al.*, 1995). Por este motivo, sería importante estudiar el efecto residual de diferentes manejos aplicados a edad temprana sobre el ambiente uterino de las vaquillonas al primer servicio.

El crecimiento y la reproducción están altamente regulados por el eje somatotrófico, integrado por la hormona del crecimiento (GH) y su receptor (GHR), los factores de crecimiento similares a la insulina tipos I y II (IGF-I, IGF-II), y sus receptores y proteínas de unión (IGFBP1-6) (Laron, 2001). Un alto plano nutricional durante la lactancia está asociado con un aumento en las concentraciones plasmáticas de IGF-I al destete (Guggeri *et al.*, 2014), con potenciales efectos en la eficiencia reproductiva de las vacas. Sin embargo, se desconoce si los cambios nutricionales aplicados a edad temprana tienen un impacto de mediano plazo en el funcionamiento del eje somatotrófico.

Por lo tanto, nos planteamos la hipótesis de que las altas ganancias de peso vivo a edad temprana tienen un efecto de mediano plazo en el funcionamiento de eje somatotrófico, que podría favorecer el desempeño reproductivo de las vaquillonas al primer servicio. El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de diferentes sistemas de manejo impuestos entre los 75 a 158 días de edad, en la concentración de hormonas reproductivas y metabólicas y en la expresión génica en hígado y endometrio de miembros del eje somatotrófico al momento del primer servicio en vaquillonas Hereford.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en la Estación Experimental Glencoe de INIA. Los animales provenían de un experimento anterior, en el cual se utilizaron 46 terneras Hereford, hijas de vacas multíparas de  $75 \pm 1,5$  días de edad y  $79,4 \pm 2,9$  kg de peso vivo, las que fueron asignadas al azar a 3 grupos con 2 repeticiones y se sometieron a tres medidas de manejo: destete precoz a los  $75 \pm 1,5$  días de edad (DP), destete tradicional a los  $158 \pm 1,5$  días de edad (DTr) y destete tradicional con creep feeding (CF) desde los  $75 \pm 1,5$  a  $158 \pm 1,5$  días de edad (DTr+CF). A los  $709 \pm 1,5$  días (edad del primer servicio), un grupo de 22 vaquillonas con al menos dos fases luteales consecutivas fueron seleccionadas para éste experimento, conformado por 8 vaquillonas del grupo DP ( $380 \pm 10,9$  kg y  $2,4 \pm 0,5$  fases luteales), 7 vaquillonas del grupo DTr ( $375 \pm 11,7$  kg y  $2,7 \pm 0,5$  fases luteales) y 7 vaquillonas del grupo DTr+CF ( $3,4 \pm 0,6$  fases luteales). Se realizó sincronización de celos con dos dosis de prostaglandina ( $0,0015$  mg intramuscular) con un intervalo de 11 días y detección de celos para determinar el inicio del primer ciclo estral (día 0=celo), se administró una tercera dosis de prostaglandina el día 16, y se volvió a detectar celo y realizar el seguimiento hasta el día 7 del siguiente ciclo estral. Las biopsias de hígado y endometrio se tomaron coincidiendo aproximadamente con el momento de la eclosión embrionaria (día 7) y del reconocimiento materno de la preñez (día 16). Se colectaron muestras de sangre diariamente por venopunción yugular para la determinación de progesterona y de IGF-I y leptina los días 7 y 16 del ciclo. Las variables continuas con medidas repetidas en el tiempo fueron analizadas utilizando el procedimiento mixto de SAS, ajustando las diferencias por el test de Tukey-Kramer. Se calculó el área debajo de la curva para las concentraciones de progesterona, que fue utilizada como covariable para analizar su efecto en la expresión génica uterina. La frecuencia de vaquillonas en cada grupo que habían iniciado la luteólisis el día 16

fue analizada por glimmix. Valores de  $P > 0,05$  fueron considerados no significativos y tendencia los valores de  $P$  entre  $0,05-0,1$ .

**Resultados**

**Concentraciones plasmáticas de hormonas**

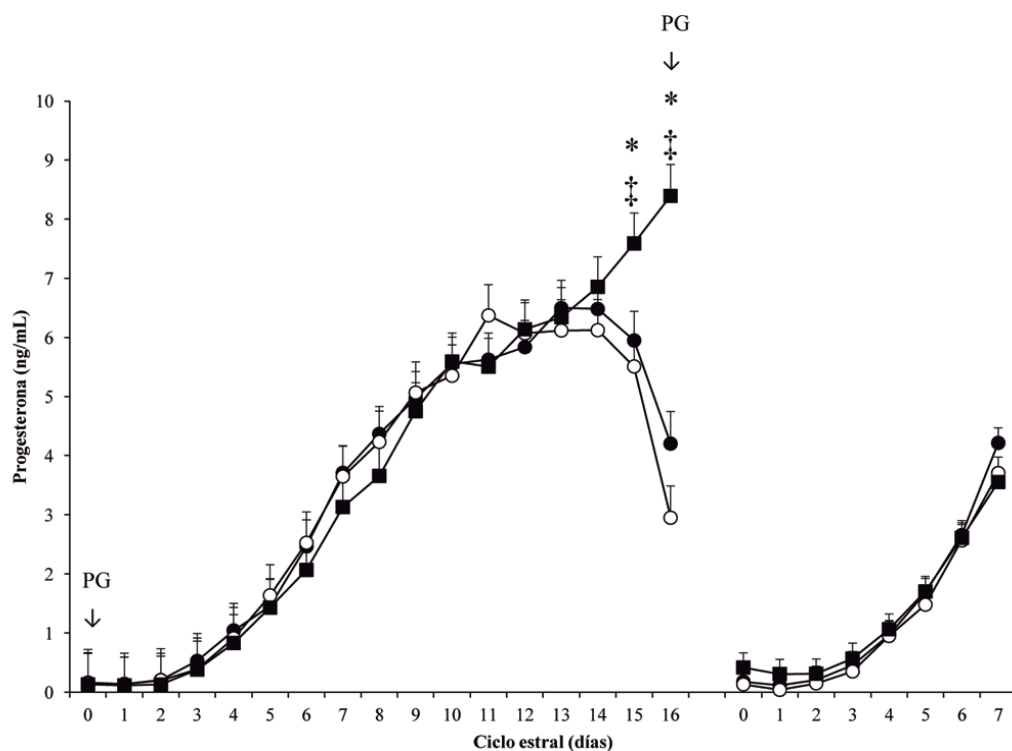
El número de vaquillonas que comenzaron la luteolisis el día 16 del ciclo tendió a ser mayor en los grupos DP (6/8) y DTr (5/7) comparado con el DTr+CF (1/7) ( $P=0,07$ ). Las vaquillonas del grupo DTr+CF presentaron una mayor concentración de progesterona en los días 15 y 16 que las de los demás grupos ( $P < 0,02$ ; Figura 7).

Las concentraciones de IGF-I fueron similares entre grupos y días ( $P > 0,05$ ; DP=  $243,3 \pm 25,0$  ng/mL, DTr=  $224,4 \pm 29,1$  ng/mL y DTr+CF=  $260,7 \pm 29,7$  ng/mL; Día 7=  $252,6 \pm 20,5$  ng/mL y Día 16=  $232,9 \pm 18,3$  ng/mL). No se observaron diferencias en la con-

centración de leptina entre grupos y días ( $P > 0,05$ ; DP=  $6,0 \pm 1,7$  ng/mL, DTr=  $10,2 \pm 2,0$  ng/mL and DTr+CF=  $6,7 \pm 1,8$  ng/mL; Día 7=  $7,9 \pm 1,1$  ng/mL and Día 16=  $7,5 \pm 1,1$  ng/mL).

**Expresión génica en hígado**

Al día 7, las vaquillonas del grupo DTr+CF expresaron más transcripto para GHR que las del grupo DTr ( $P=0,05$ ), siendo intermedios los valores para las del grupo DP (Figura 8). La expresión del transcripto de GHR en los grupos DP y DTr fue menor al día 7 que al día 16 ( $P < 0,05$ ), no observándose diferencias entre días para el tratamiento DTr+CF (Figura 8). El test de Tukey-Kramer mostró que la expresión del transcripto para IGFBP-3 fue mayor en las vaquillonas del grupo DTr+CF comparadas con las de los grupos DP ( $P=0,007$ ) y DTr ( $P=0,03$ ) en el día 7 (Figura 8). La expresión de IGFBP-3 se redujo del día 7 al 16 en el grupo DTr+CF, pero se mantuvo constante en los grupos DP y DTr (Figura 8).



**Figura 7.** Concentraciones de progesterona circulante durante el ciclo estral, hasta el día 16 y 7, cuando se tomaron biopsias de endometrio e hígado y se inyectó prostaglandina (PG), en vaquillonas de destete precoz (●), destete tradicional (○) y destete tradicional con creep feeding (■). PG= inyección de prostaglandina \*  $P < 0,05$  entre DTr y DTr+CF; †  $P < 0,05$  entre DTr+CF y DP.

### Expresión génica en endometrio

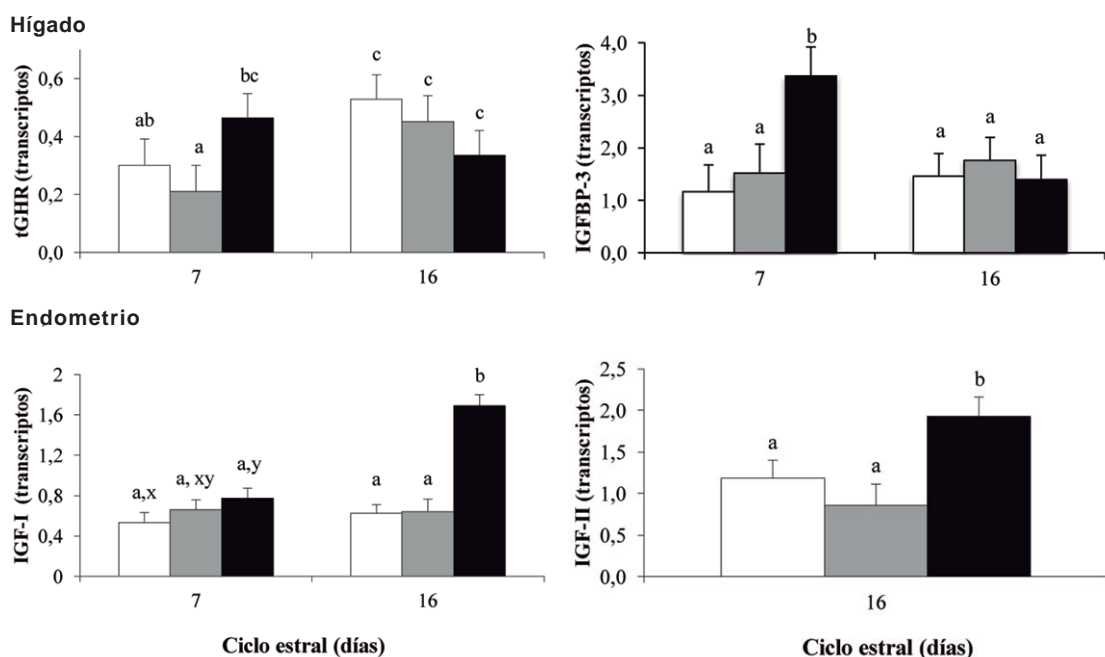
En el día 7 se observó una tendencia a mayor expresión de ARNm para IGF-I ( $P=0,1$ ), y al día 16 fue mayor para el grupo DTr+CF que para los grupos DP y DTr (Figura 8). Respecto a la expresión de ARNm para IGF-II, se encontraron mayores concentraciones del transcripto en las vaquillonas del grupo DTr+CF que en las de los grupos DP y DTr ( $P=0,04$ ; Figura 8).

### DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que describe el efecto de mediano plazo de diferentes sistemas de manejo aplicados a edades tempranas sobre la expresión de genes de miembros del eje somatotrófico en útero e hígado en vaquillonas. La expresión diferencial de los mismos ocurrió aun cuando habían desaparecido las diferencias en peso vivo inducidos por los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas.

Un alto plano nutricional y balance energético positivo están asociados con un in-

cremento en la concentración de hormonas metabólicas (Chelikani *et al.*, 2009) en la expresión de transcripto de GHR en hígado (Jiang y Lucy, 2001; Rajaram *et al.*, 1997) y con la fertilidad (Rhoads *et al.*, 2008). La ausencia de diferencias en las concentraciones de IGF-I y leptina entre grupos puede explicarse porque no existían diferencias de peso y a que se analizó solamente en los días 7 y 16 del ciclo. Una mayor expresión hepática del transcripto de GHR determina un aumento en las concentraciones séricas de IGF-I e IGFBP-3 y disminución de IGFBP-2 (Rajaram *et al.*, 1997). En este estudio la expresión hepática del transcripto de IGFBP-3 al día 7 fue mayor en las vaquillonas del grupo DTr+CF que en los grupos DP y DTr. Este resultado es relevante ya que estas proteínas de unión estimulan el desarrollo embrionario temprano en respuesta a señales del propio embrión (Liu *et al.*, 1995). Además el IGFBP-3 ayuda en el transporte de IGF-I sistémico a su tejido blanco (Jones y Clemmons, 1995), creando así un mejor ambiente para el desarrollo embrionario. El efecto de las ganancias diarias diferenciales fue



**Figura 8.** Expresión hepática y endometrial de tGHR, IGFBP-3 e IGF-I al día 7 y 16 y expresión endometrial de IGF-II al día 16 del ciclo estral en vaquillonas de grupo destete precoz (blanco), destete tradicional (gris) y destete tradicional con creep feeding (negro). a vs b vs c  $P<0,05$ ; x vs y,  $P=0,1$ .

evidente aun después de terminados los tratamientos (Guggeri *et al.*, 2014), sugiriendo que el plano nutricional aplicado a edades tempranas puede programar la sensibilidad del hígado a la acción de la GH, aumentando el IGFBP-3 hepático y potenciando la fertilidad al primer servicio.

Las mayores concentraciones de progesterona los días 15 y 16 del ciclo estral en las vaquillonas del grupo DTr+CF, podrían explicarse por la cantidad de ciclos estrales previos (Guggeri *et al.*, 2014). Este resultado sería muy relevante ya que la fertilidad al celo puberal es menor que la que ocurre al tercer celo (Byerley *et al.*, 1987), debido a la existencia de fases luteales cortas con baja secreción de progesterona después de la primera ovulación (Gasser 2013). Sin embargo, las vaquillonas de todos los grupos seleccionadas para este experimento presentaban al menos 2 fases luteales previas, motivo por el cual las diferencias encontradas en las concentraciones de progesterona estarían explicadas por un mayor soporte luteotrófico brindado por factores de crecimiento sistémicos u hormonas metabólicas (Spicer y Echterkamp, 1995).

En este trabajo, el grupo DTr+CF tuvo una mayor expresión endometrial del transcripto de IGF-I al día 7 y 16 y de IGF-II al día 16 comparados con los otros grupos. La mayor expresión endometrial de IGF-I e IGF-II en el grupo DTr+CF en nuestro estudio, es compatible con un mayor tamaño embrionario, como fue descrito anteriormente en ovinos (Sequeira *et al.*, 2016). Las vaquillonas del grupo DTr+CF también presentaron mayores concentraciones de progesterona los días 15 y 16 del ciclo estral comparados con las de DP y DTr. Algunos estudios evidencian que las concentraciones de progesterona en la fase luteal temprana cambian el transcriptoma endometrial, favoreciendo el ambiente uterino y su capacidad de promover un adecuado desarrollo embrionario (Spencer *et al.*, 2017). Por este motivo, el área debajo de la curva de progesterona fue utilizada como covariable en el modelo estadístico, demostrando que el IGF-II, pero no el IGF-I, fue afectado por esta hormona. Por lo tanto, las diferencias en expresión génica de IGF-I en en-

dometrio serían parte del efecto de mediano plazo de altos planos nutricionales aplicados a edades tempranas.

Concluimos que la mejora en el plano nutricional de terneras lactantes pastoreando en campo natural, tiene un efecto de mediano plazo en la expresión de genes de miembros del eje somatotrófico en hígado y útero. Estos efectos podrían reducir las pérdidas embrionarias a través del incremento en la sensibilidad del hígado a la GH, mayor expresión endometrial de IGF-I e IGF-II y promoción del desarrollo embrionario asociado a mayores concentraciones de progesterona en el período crítico del reconocimiento materno de la preñez.

## BIBLIOGRAFÍA

- Byerley DJ et al. (1987) Pregnancy rates of beef heifers bred either on pubertal or third estrus. *Journal of Animal Science* 65:645–650.
- Chelikani PK et al. (2009) Effects of dietary energy and protein density on plasma concentrations of leptin and metabolic hormones in dairy heifers. *Journal of dairy science* 92:1430–1441.
- Gasser CL (2013) Beef species symposium, considerations on puberty in replacement beef heifers. *Journal of Animal Science* 1336–1340.
- Guggeri D et al. (2014) Effect of different management systems on growth, endocrine parameters and puberty in Hereford female calves grazing Campos grassland. *Livestock Science* 167:455–462.
- Gunn RG, Sim DA, Hunter EA (1995) Effects of nutrition in utero and in early life on the subsequent lifetime reproductive performance of Scottish Blackface ewes in two management systems. *Animal Science* 60:223–230.
- Hall JB et al. (1995) Body composition and metabolic profiles associated with puberty in beef heifers. *Journal of animal science* 73:3409–3420.
- Hopper HW et al. (1993) Effect of prepubertal body weight gain and breed on carcass composition at puberty in beef heifers. *Journal of animal science* 71:1104–1111.

- Jiang H, Lucy MC (2001) Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: Isolation, expression and effects on translational efficiency. *Gene* 265:45–53.
- Jones JI, Clemmons DR (1995) Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions. *Endocrine Reviews* 16.
- Laron Z (2001) Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Mol Pathol* 54:311–316.
- Liu HC et al. (1995) Production of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) by human endometrial stromal cell is stimulated by the presence of embryos. *Journal of assisted reproduction and genetics* 12:78–87.
- Rajaram S et al. (1997) Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins in Serum and Other Biological Fluids/ : Regulation and Functions \*. *Endocrine Reviews* 18:801–831.
- Rhind S. et al. (1998) Effects of restriction of growth and development of Brecon Cheviot ewe lambs on subsequent lifetime reproductive performance. *Small Ruminant Research* 30:121–126.
- Rhoads ML et al. (2008) Uterine and Hepatic Gene Expression in Relation to Days Postpartum, Estrus, and Pregnancy in Postpartum Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 91:140–150.
- Sequeira M et al. (2016) Gestation-related gene expression and protein localization in endometrial tissue of Suffolk and Cheviot ewes at gestation Day 19, after transfer of Suffolk or Cheviot embryos. *Theriogenology* 86:1557–1565.
- Spencer TE et al. (2017) Insights into conceptus elongation and establishment of pregnancy in ruminants. *Reproduction, Fertility and Development* 29:84–100.
- Spicer LJ, Echterkamp SE (1995) The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 12:223–245.
- Wiltbank JN et al. (1966) Effects of Heterosis on Age and Weight at Puberty in Beef Heifers. *Animal Science* 25:744–751.