

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**MODULACIÓN DEL EJE METABÓLICO POR LOS
ESTEROIDES SEXUALES EN OVINOS**

por

María Jimena GÓMEZ ZABALA

**TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Ingeniero Agrónomo**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2013**

Tesis aprobada por:

Director:

Dra. Elize van Lier

Ing. Agr. Mariana Carriquiry

Dra. Ana Meikle

Fecha:

18 de febrero del 2013

Autor:

María Jimena Gómez

AGRADECIMIENTOS

Un especial y enorme agradecimiento a mi familia, que siempre me impulso para que tuviera una formación profesional, pero sobre todo por el apoyo incondicional en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi carrera.

Un agradecimiento a mis amigas de la vida, a las que conocí en esta facultad y a Fede por acompañarme en todo momento.

Gracias a la Ing. Agr. Mariana Carriquiry y a la Dra. Ana Meikle por haberme formado en el área de investigación y por su gran apoyo a lo largo de mi tesis.

Agradezco a la Lic. Jimena Laporta y Andrea Fernández por su participación y apoyo a lo largo de este trabajo.

Finalmente, un enorme gracias a la Dra. Elize van Lier por integrarme al mundo de la investigación, abrirme tantas puertas, y por ser mi directora de tesis.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTO.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCION</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	4
2.1. <u>ENDOCRINOLOGÍA</u>	4
2.1.1 <u>Definición de hormona</u>	4
2.1.2 <u>Clasificación de las hormonas</u>	5
2.1.3 <u>Transporte de las hormonas</u>	7
2.1.4 <u>Receptores hormonales</u>	7
2.1.4.1. Receptores de membrana.....	8
2.1.4.2. Receptores intracelulares.....	8
2.1.5. <u>Acción hormonal</u>	8
2.1.5.1. Mecanismo de acción de las hormonas Proteicas.....	8
2.1.5.2. Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas y tiroideas.....	10
2.1.6. <u>Regulación de la secreción hormonal</u>	11
2.1.7. <u>Eje hipotálamo – hipófisis</u>	13
2.2. <u>EJE REPRODUCTIVO</u>	14
2.2.1. <u>Regulación del eje reproductivo</u>	14
2.2.1.1. Regulación endócrina en la hembra.....	14
2.2.1.2. Regulación endócrina en el macho.....	16
2.2.2. <u>Función de los esteroides sexuales</u>	17
2.3. <u>EJE METABÓLICO</u>	18
2.3.1. <u>Metabolismo y las hormonas involucradas</u>	18
2.3.1.1. Hormona de crecimiento (GH).....	19
2.3.1.2. Factor insulinémico I (IGF-I).....	20
2.3.1.3. Insulina.....	21
2.3.1.4. Leptina.....	22

2.3.2. <u>Regulación del eje metabólico</u>	23
2.4. INTERACCIONES ENTRE LOS EJES REPRODUCTIVO Y METABÓLICO.....	24
2.4.1. <u>Efecto del eje metabólico sobre la reproducción</u>	25
2.4.2. <u>Efecto del eje reproductivo sobre el metabolismo</u>	30
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	33
3.1. UBICACIÓN.....	33
3.2. ANIMALES.....	33
3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	34
3.4. VARIABLES ANALIZADAS.....	35
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
4. <u>RESULTADOS</u>	38
4.1. TESTOSTERONA Y ESTRADIOL.....	38
4.2. EXPRESIÓN RELATIVA DE GENES CONTROL: HPRT Y RPL19.....	39
4.3. EXPRESIÓN RELATIVA DE TRANSCRIPTOS EN HÍGADO.....	40
4.4. EXPRESIÓN RELATIVA DE TRANSCRIPTOS EN ADIPOSO.....	42
5. <u>DISCUSIÓN</u>	44
6. <u>CONCLUSIONES</u>	48
7. <u>RESUMEN</u>	49
8. <u>SUMMARY</u>	50
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	51

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Clasificación de algunas hormonas según su estructura química.....	5
2. Peso vivo (kg) y condición corporal promedio para carneros y ovejas antes del sacrificio.....	34
3. Valores de P para los efectos de sexo y tratamiento, su interacción y los contrastes entre los grupos para los genes control de hígado y tejido adiposo.....	39
4. Valores de P para los efectos sexo y tratamiento, su interacción y los contrastes entre grupos para cada uno de los transcritos de los genes RE α , RGH, IGF-I,RI y RLEP, en muestras de hígado	40
5. Valores de P para los efectos sexo y tratamiento, su interacción y las comparaciones de grupos para cada uno de los transcritos de los genes RE α , RA, RGH, IGF-I, RI y RLEP, en muestras de tejido adiposo.....	42
Figura No.	
1. Mecanismos de comunicación celular.....	6
2. Receptores celulares de membrana e intracelulares.....	8
3. Mecanismo de acción de las hormonas proteicas.....	10
4. Ejemplo de mecanismo de acción de hormonas esteroideas y tiroideas.....	11

5. Retroalimentación positiva y negativa.....	12
6. Mecanismo de retroalimentación largo, corto y ultracorto.....	12
7. Esquema del eje hipotálamo – hipófisis.....	13
8. Esquema simplificado de las interrelaciones hormonales del eje hipotálamo – hipófisis – ovario Nota: El efecto positivo de los estrógenos sobre el centro cíclico del hipotálamo se da a altas concentraciones de los mismos y cuando las concentraciones de progesterona están en su mínimo.....	15
9. Control hormonal en machos.....	17
10. Representación del eje metabólico.....	24
11. Diagrama que muestra donde actúan algunas de las hormonas metabólicas a nivel del eje reproductivo. Nota: las flechas indican efectos positivos, la flecha punteada indica un mecanismo de regulación en el cual se supone su existencia.....	29
12. Representación esquemática del diseño experimental. La hora 0 corresponde a las 7 am. BE = Benzoato de Estradiol; CT = Ciclopentilpropionato de Testosterona.....	35
13. Nivel de estradiol (pmol/L, ± EEM) y testosterona (nmol/L, ± EEM) en plasma de animales tratados, durante las 72 horas post inyección de Benzoato de Estradiol (ovejas) y Ciclopentilpropionato de Testosterona (carneros).....	38
14. Expresión relativa de los genes RE α , RGH, IGF-I, RI y REPL en hígado de ovinos gonadectomizados con o sin remplazo de esteroides sexuales (OVX: ovejas ovariectomizadas; OVX+BE: ovejas ovariectomizadas con Benzoato de Estradiol; TX: carneros orquiectomizados; TX+CT: carneros orquiectomizados con Ciclopentilpropionato de Testosterona). Letras diferentes (a,b) indican diferencias significativas	

(P<0,05), asteriscos (*) indican tendencia (P<0.100).....	41
15. Expresión relativa de los genes RE α , RA, RGH, IGF-I, RI y RLEP en tejido adiposo de ovinos gonadectomizados con o sin remplazo de esteroides sexuales (OVX: ovejas ovariectomizadas; OVX+BE: ovejas ovariectomizadas con Benzoato de Estradiol; TX: carneros orquiectomizados; TX+CT: carneros orquiectomizados con Ciclopentilpropionato de Testosterona). Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).....	43

1. INTRODUCCIÓN

Desde el año 1991 en el Uruguay se ha dado una importante baja en las existencias ovinas. Históricamente ocurrió como consecuencia de la pérdida de rentabilidad que tuvo la actividad debido a la caída de los precios de la lana, y en la actualidad debido a la baja eficiencia reproductiva y en menor medida, a la alta tasa de extracción por los altos precios de la carne (Acosta, 2010). Se pasó de los 25 millones récord del año 1991 a los 7 millones de la actualidad (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011).

La baja eficiencia reproductiva se debe a que el rubro quedó a nivel nacional restringido a las zonas de Basalto, Cristalino y Sierras. Dentro de los sistemas ganaderos pasó a ser un rubro secundario descuidando aspectos de manejo importantes como la asignación de forrajes y la sanidad, entre otros, dando prioridad en el uso de los recursos al ganado bovino que resultaba de mayor rentabilidad (Seminario de Actualización Técnica de Reproducción Ovina, 2005).

En los últimos años se ha dado una importante alza en los precios, tanto para lana como para carne, debido al aumento en la demanda y la baja oferta internacional de estos productos. El rubro se coloca en una situación muy diferente a la que ocurrió en años anteriores que provocaron su retracción, aunque hoy también existen otros rubros con una coyuntura favorable para los precios con los que la actividad compite por los recursos (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011).

Existe en la actualidad la necesidad de mejorar la productividad del rubro ovino, para esto se deben desarrollar tecnologías que levanten las limitantes existentes mejorando la eficiencia en el uso de los factores de producción y de los procesos fundamentales como son la reproducción, el crecimiento y la lactación. Para esto es necesario conocer y comprender los factores que determinan la eficiencia de los procesos del animal, y el metabolismo es el mecanismo por el cual los sistemas vivos adquieren y utilizan

la energía para llevar a cabo funciones vitales, como el mantenimiento, y la reproducción. En este contexto, el objetivo de este trabajo es incrementar el conocimiento de las interacciones entre el eje metabólico y el eje sexual-reproductivo, a modo de entender mejor por qué las hembras y los machos reaccionan diferente a medidas de manejo que afectan el estatus metabólico, permitiendo generar estrategias que aumenten la productividad del rubro.

Estrógenos y andrógenos secretados por los órganos sexuales son los moduladores más importantes de la función reproductiva de la hembra y el macho, respectivamente. Sus acciones están mediadas principalmente por su unión a receptores intracelulares específicos en las células blanco, y la subsiguiente estimulación de la transcripción génica (Tsai y O'Malley, 1994).

Por otro lado, el eje metabólico también cuenta con regulación hormonal. El hígado en respuesta a la hormona de crecimiento (GH) secreta el factor de crecimiento tipo insulémico-I (IGF-I), cuya acción está mediada por el receptor de IGF tipo-1 (IGF-1R) y modulada por seis proteínas de unión (IGFBPs) (Cohick, 1998). Muchos tejidos extra-hepáticos también expresan IGF-I, y como el IGF-1R se encuentra ampliamente distribuido en el organismo animal, se acepta que además del mecanismo endócrino, la IGF-I tiene acción autócrina/parácrina. El rol de la IGF-I mediando la función ovárica y/o uterina ha sido revisado recientemente en vacas (Lucy 2000, Lucy 2003) y ovejas (Scaramuzzi et al., 2006). Otra hormona metabólica es la leptina y es secretada principalmente por los adipocitos. Sus acciones contribuyen a los cambios en el consumo de alimento y en funciones dependientes de energía como la reproducción (Bosclair et al., 2006).

Existe evidencia que los estrógenos también regulan la expresión del sistema IGF, de leptina y su receptor. Los andrógenos y estrógenos, incrementan el crecimiento muscular en numerosas especies. Implantes de acetato de trenbolona y estradiol, incrementan la expresión de ARNm de IGF-I en músculo de novillos e hígado de corderos (Johnson et al., 1998).

A partir de la evidencia que muestra que los esteroides sexuales afectan el eje metabólico, se formuló este trabajo con la hipótesis de que estrógenos y andrógenos tienen un efecto en la expresión génica de tejidos típicamente metabólicos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ENDOCRINOLOGÍA

El sistema endócrino tiene la función de mantener la homeostasis del cuerpo a través de señales químicas que coordinan múltiples funciones (Chedrese, 2009).

2.1.1. Definición de hormona

Se le llama “hormona” a aquellas señales químicas que mantienen la homeostasis (Chedrese, 2009). La palabra “hormona” proviene del verbo griego “hormáo” que significa excitar o poner en marcha (Real Academia Española, 2001). Son entonces, sustancias químicas que tienen la función de llevar señales a células diana, son elaboradas por células especializadas, las que pueden constituir glándulas endócrinas propiamente dicho o estar dispersos en otros órganos o tejidos. Esta señal es transportada por diferentes vías, llevando el mensaje de iniciar, detener o regular un proceso celular (García Sacristán et al., 1995). Diferentes funciones corporales pueden ser controladas por una o varias hormonas, y una hormona dada puede intervenir en la regulación de varias funciones corporales (García Sacristán et al., 1995).

Las principales funciones de las hormonas, tienen que ver con: la regulación del metabolismo, el desarrollo y crecimiento, la reproducción, el comportamiento y el poder de adaptación de las especies (Fernández Abella, 1993).

2.1.2. Clasificación de las hormonas

Podemos clasificar a las hormonas según su estructura química en: peptídicas y proteicas, esteroides, ácidos grasos y aminas (Hafez y Hafez, 2002).

Cuadro 1. Clasificación de algunas hormonas según su estructura química.

HORMONAS PEPTÍDICAS Y PROTEICAS	Hormona folículo estimulante (FSH), Hormona luteinizante (LH), Somatotropina (GH), Hormona estimuladora de la tiroides (TSH), Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), Insulina
HORMONAS ESTEROIDES	Progesterona, Andrógenos (e.o. Testosterona), Estrógenos (e.o. Estradiol)
HORMONAS AMINAS	Tiroxina, Triiodotironina, Melatonina, Epinefrina
HORMONAS DERIVADAS DE LOS ÁCIDOS GRASOS	Prostaglandinas

Tanto las hormonas esteroideas como las aminas son hormonas liposolubles o hidrófobas, esto implica que atraviesen fácilmente la membrana celular. Por lo tanto no se pueden almacenar en la célula y circulan por el torrente sanguíneo unidas a proteínas (Randall et al., 1998).

Por el contrario, las hormonas proteicas son lipófilas o hidrosolubles, por lo que no pueden atravesar la membrana celular encontrándose sus receptores en la superficie (García Sacristán et al. 1995, Randall et al. 1998). Las prostaglandinas si bien son liposolubles se unen a receptores en la superficie celular y tienen un efecto rápido y de corta duración similar al de las hormonas lipófilas (Randall et al., 1998).

Otra forma de clasificarlas es a través de la forma de comunicación, esta puede ser: endócrina, parácrina, autócrina y neurócrina. La comunicación endócrina corresponde a las hormonas que son secretadas y transportadas por el torrente sanguíneo hacia células lejanas, en la comunicación parácrina las hormonas actúan sobre células vecinas; la comunicación autócrina corresponde a aquellas células que secretan mensajeros químicos que actúan sobre la misma célula que las originó, y la comunicación neurócrina corresponde a señales entre neuronas y células lejanas (neurohormonas) (Hafez y Hafez, 2002) (figura 1).

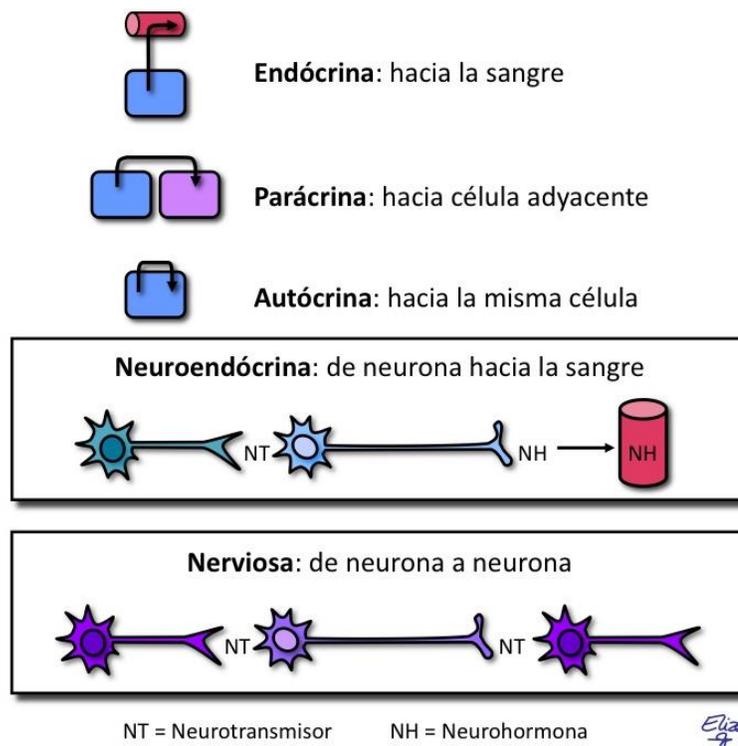


Figura 1. Mecanismos de comunicación celular.

2.1.3. Transporte de las hormonas

Luego de que las hormonas peptídicas son sintetizadas por la glándula correspondiente, se almacenan dentro de la misma hasta que son requeridas, circulan libremente en el torrente sanguíneo siendo degradadas o captadas por tejidos diana rápidamente (García Sacristán et al. 1995, Randall et al. 1998). No es el caso de las hormonas esteroideas, que son liberadas a medida que se producen, no se almacenan (García Sacristán et al., 1995).

Las hormonas esteroideas y las aminas de naturaleza hidrófoba, cuando son liberadas al torrente sanguíneo, se unen a transportadores proteicos manteniéndolas inactivas, además de evitar que sean degradadas y eliminadas. Sin los transportadores no se podrían disolver (ya que la sangre es una solución acuosa). Una vez que las hormonas se disocian de sus proteínas transportadoras, pueden entrar en la célula diana uniéndose a un receptor intracelular específico (Randall et al., 1998).

2.1.4. Receptores hormonales

Para la comunicación celular (ya sea endócrina, exócrina, parácrina o autócrina) es necesario que las hormonas se unan a las células diana a través de moléculas proteicas específicas llamadas receptores. Hay receptores que se ubican en la superficie de la membrana celular y otros intracelulares que se encuentran en el núcleo (Randall et al., 1998) (figura 2).

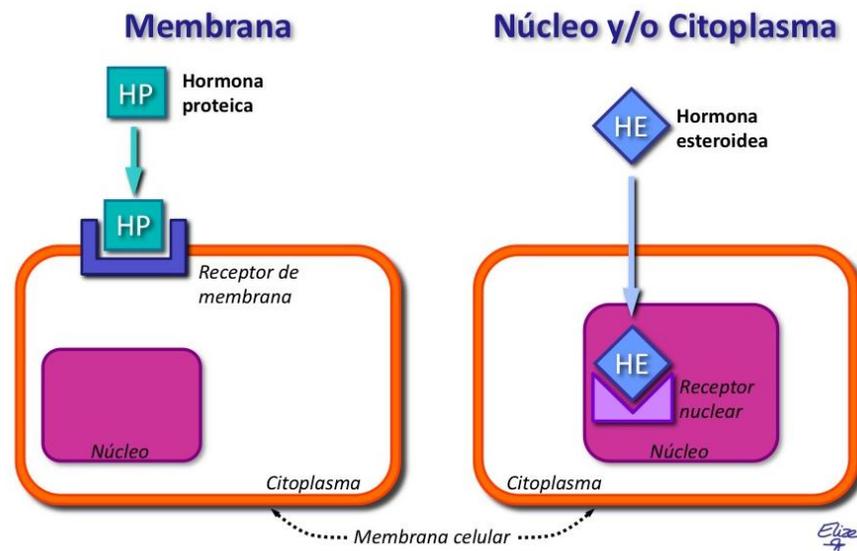


Figura 2. Receptores hormonales de membrana e intracelulares.

2.1.4.1. Receptores de membrana

En el caso de las hormonas polipeptídicas, como son moléculas lipófilas y de gran tamaño que no pueden atravesar las membranas celulares, se unen a receptores que se encuentran en la superficie de la membrana celular. Estos receptores reconocen las señales reguladoras del exterior para después transmitirlos y amplificarlos en el interior de la célula (Mayo, 2005).

2.1.4.2. Receptores intracelulares

Las hormonas liposolubles como los esteroides y las hormonas tiroideas que son moléculas de menor tamaño, entran a la célula por difusión a través de la membrana celular (Mayo, 2005). La hormona en la célula diana, forma un complejo receptor-hormona que actuará en el núcleo donde actuará regulando la expresión génica (Randall et al., 1998).

2.1.5. Acción hormonal

2.1.5.1. Mecanismo de acción de las hormonas proteicas

Las hormonas proteicas se unen a su receptor de membrana específico activando la adenil-ciclase, una enzima que determina el pasaje de ATP a AMPc y pirofosfato (Fernández Abella, 2003) (figura 3). Según este modelo la hormona actuaría como un “primer mensajero” y el AMPc como “segundo mensajero” (Sutherland y Rall, 1960), aunque éste no es el único compuesto que pueda actuar de segundo mensajero. El primer mensajero (hormona) actúa en la superficie externa de la membrana celular mientras que el segundo mensajero se produce en la superficie interna de la membrana, por lo que la hormona no penetra en la célula para transmitir su señal (Randall et al., 1998). El segundo mensajero activa la enzima proteinoquinasa que está formada por dos subunidades, una reguladora y otra catalítica, que a su vez están formadas por dos subunidades. Al unirse el AMPc a la subunidad reguladora, esta se separa y las subunidades catalíticas se activan catalizando la fosforilación de una o más proteínas celulares (Fernández Abella, 1993).

Dependiendo de la hormona actuante, la adenil-ciclase tiene una determinada estimulación máxima y es estimulada con un determinado rango de concentración. Además del AMPc existen otros mensajeros secundarios (como el calcio, la clamodulina y el GMPc) que actúan incrementando los niveles de otras sustancias (Birnbaumer y Kirchick, Flawiá y Torres, citados por Fernández Abella, 1993).

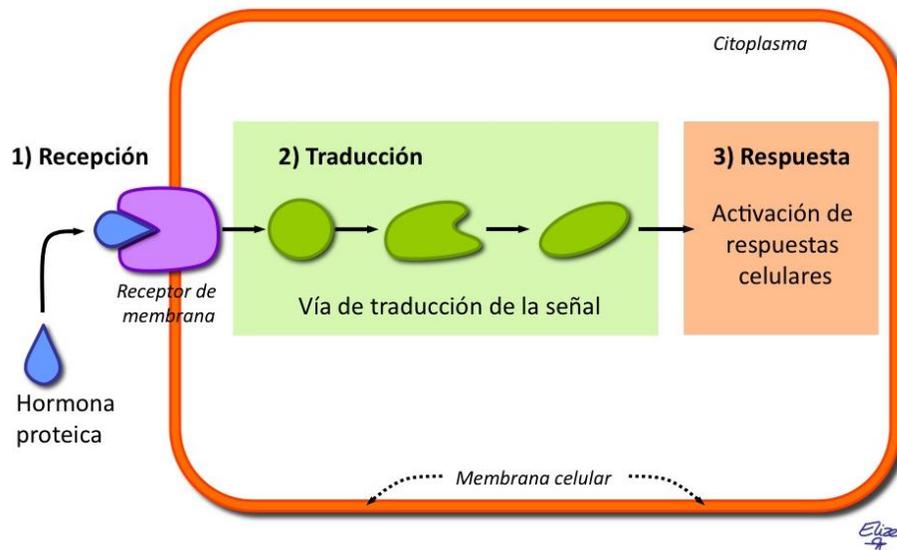


Figura 3. Mecanismo de acción de las hormonas proteicas.

2.1.5.2. Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas y tiroideas

Las hormonas esteroideas y tiroideas por su naturaleza liposoluble entran y salen de las células al azar, pero solo actúan sobre las células diana específicas (Randall et al., 1998). Una vez en la célula diana, se forma un complejo receptor-hormona, esta unión se da por un dominio de unión al ADN que comparten la hormona y el receptor. El dominio de unión al ADN del receptor se une a secuencias reguladoras específicas del ADN, regulando la transcripción de genes específicos al ARN mensajero correspondiente que sale del núcleo e induce al retículo endoplasmático a producir una proteína en particular (figura 4) (Fernández Abella 1993, Randall et al. 1998).

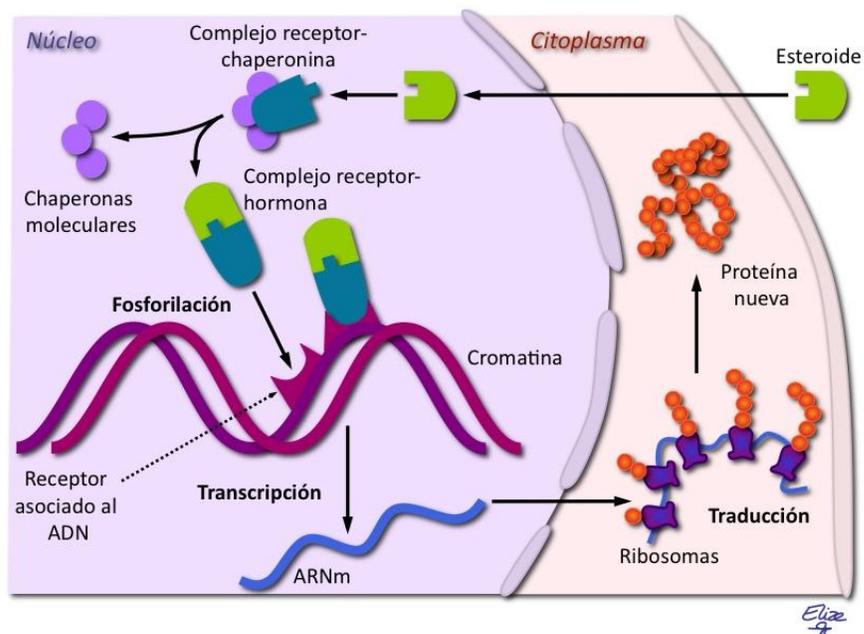


Figura 4. Ejemplo de mecanismo de acción de hormonas esteroideas y tiroideas.

2.1.6. Regulación de la secreción hormonal

A través de mecanismos de retroalimentación endócrina, el sistema nervioso regula la actividad de las glándulas (Hafez y Hafez, 2002). Una hormona que fue secretada por una determinada glándula puede afectar la secreción de la hormona que estimuló su liberación, de forma positiva o negativa (Hafez y Hafez, 2002). El mecanismo de retroalimentación negativa es el más común: la hormona 1 (secretada por la glándula 1) estimula la secreción de la hormona 2 por la glándula 2, y luego la hormona 2 inhibe la secreción de la hormona 1 por la glándula 1. Al dejarse de secretar hormona 1, la glándula 2 no puede seguir secretando hormona 2, por lo que se desaparece el efecto inhibitor sobre la glándula 1 (García Sacristán et al., 1995) (figura 5). En el caso de la retroalimentación positiva, concentraciones crecientes de la hormona 1 provoca que la glándula 2 secrete hormona 2, que estimula la glándula 1 a

secretar más hormona 1. (García Sacristán et al. 1995, Hafez y Hafez 2002) (figura 5). La retroalimentación positiva lleva a niveles crecientes de las hormonas y está asociado a fenómenos que se controlan por rotura de la estructura que secreta una de las hormonas, como por ejemplo la ovulación.

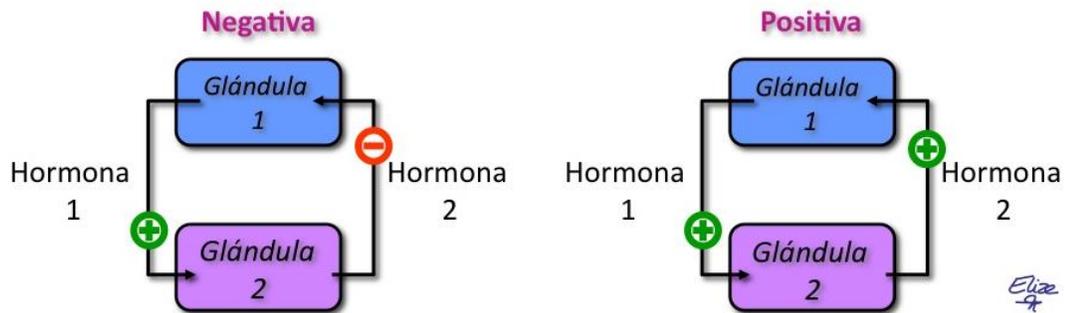


Figura 5. Retroalimentación positiva y negativa.

Estos circuitos de retroalimentación pueden ser: largos, cortos o ultracortos (Fernández Abella, 1993). A modo de ejemplo, en la vía larga interactúan el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas, si miramos la figura 6, la glándula 1 sería el hipotálamo que secreta la GnRH estimulando a la hipófisis (glándula 2) a producir LH, que al actuar sobre los testículos (glándula 3) lo estimula a secretar testosterona que inhibe al hipotálamo (Fernández Abella, 1993).

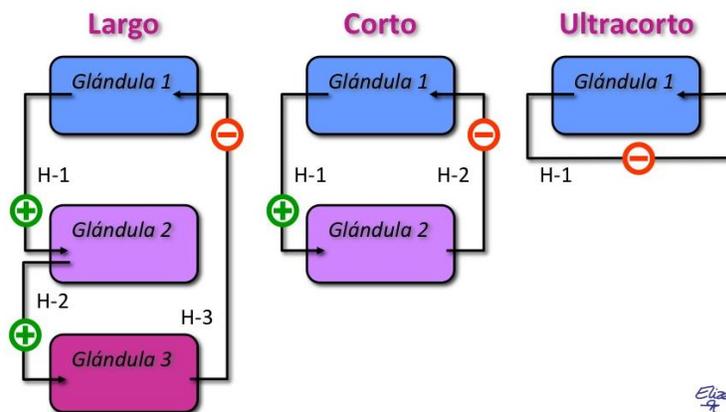


Figura 6. Mecanismos de retroalimentación largo, corto y ultracorto.

2.1.7. Eje Hipotálamo – Hipófisis

El sistema endócrino y el sistema nervioso están fuertemente relacionados, pues el hipotálamo regula la secreción de hormonas por la hipófisis mediante las neurohormonas (Randall et al., 1998). La comunicación entre el hipotálamo y la hipófisis se da por un lado a través de un sistema vascular portahipofisario y por otro lado por una conexión nerviosa (Fernández Abella, 1993) (figura 7). La hipófisis, o glándula pituitaria, se divide en neurohipófisis y adenohipófisis. La neurohipófisis almacena y secreta dos neurohormonas provenientes del hipotálamo que se transportan en el interior de los axones del eje hasta los terminales nerviosos de la neurohipófisis. Por otro lado, el hipotálamo se comunica con la adenohipófisis por sangre. La hipófisis secreta una gran cantidad de hormonas; estas pueden ser de acción trófica regulando la secreción de otros tejidos endócrinos (p.e.: tiroides, gónadas, corteza adrenal) o pueden actuar directamente sobre tejidos diana (García Sacristán et al. 1995, Randall et al. 1998).

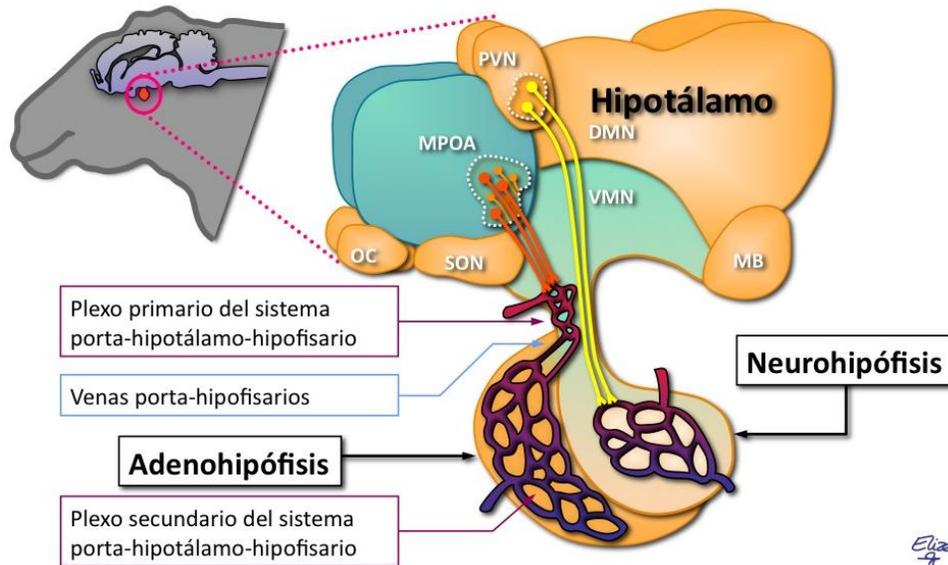


Figura 7. Esquema del eje hipotálamo – hipófisis (adaptado de Senger, 2005).

2.2. EJE REPRODUCTIVO

La reproducción implica la interacción de gametos producidos por el macho y por la hembra. En el caso del macho la producción de gametos es continua, pero en las hembras es un proceso cíclico, regulado por la interacción endócrina que ocurre entre los ovarios, la hipófisis y el hipotálamo (García Sacristán et al., 2005).

2.2.1. Regulación del eje reproductivo

2.2.1.1. Regulación endócrina en la hembra

La GnRH se sintetiza en núcleos de neuronas que se encuentran en dos zonas del hipotálamo: la zona preóptica anterior y la zona arqueada; siendo transportada a la adenohipófisis (a través del sistema porta) donde se une a su receptor (GnRHR) activando las proteínas que sintetizan y liberan la LH y FSH (García Sacristán et al., 1995). La zona anterior del hipotálamo amplifica señales aferentes relacionadas con la ovulación (centro cíclico), es responsable de la secreción cíclica de la LH y FSH; la zona arqueada (hipotálamo medio, centro tónico) regula las descargas basales de LH y FSH a través de pulsos de GnRH; el hipotálamo posterior estimula la secreción de FSH (Fernández Abella, 1993) (figura 8).

Al comienzo de la fase folicular, los folículos inmaduros secretan bajas cantidades de estrógeno que generan un efecto de retroalimentación negativa en el hipotálamo y la hipófisis, provocando la secreción tónica de la LH y FSH. Durante la fase luteal, el cuerpo lúteo produce altas cantidades de progesterona, mientras que los estrógenos están en bajas concentraciones, generándose una retroalimentación negativa, disminuyendo los niveles de la

GnRH a los basales (García Sacristán et al., 1995). La progesterona actúa a nivel del hipotálamo inhibiendo la síntesis de GnRH, y el estradiol actúa a nivel de la hipófisis disminuyendo la respuesta a la GnRH (Fernández Abella, 1993). Al final del diestro, al destruirse el cuerpo lúteo, caen los niveles de progesterona, disminuyendo la retroalimentación negativa que tenía esta hormona sobre el hipotálamo, aumentando la frecuencia pulsátil de la LH y FSH, estimulando el desarrollo de los folículos, aumentando la concentración de estrógeno circulante. La alta concentración de estrógeno, estimula las neuronas hipotalámicas a producir el pico de GnRH, estimulando la zona anterior del hipotálamo mediante retroalimentación positiva, produciéndose el pico de LH que desencadena la ovulación (figura 8) determinando el fin de la fase folicular y el comienzo de la fase luteal (García Sacristán et al., 1995).

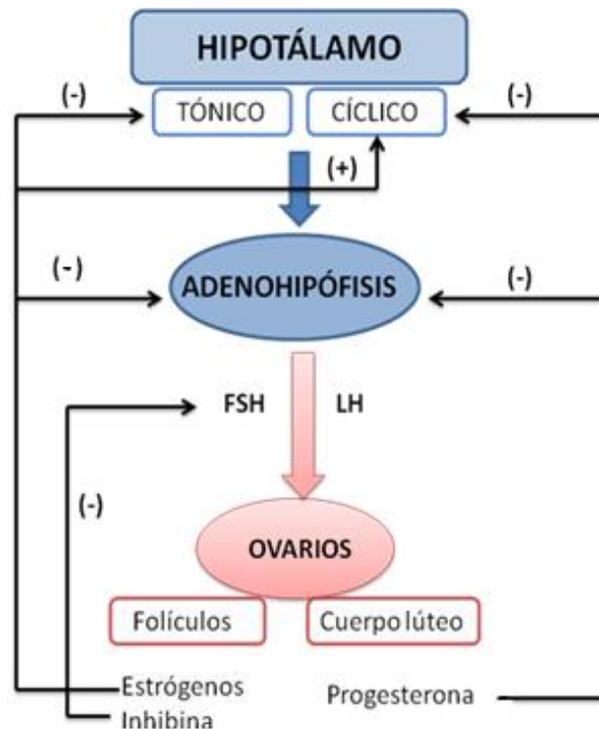


Figura 8. Esquema simplificado de las interrelaciones hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Nota: El efecto positivo de los estrógenos sobre el centro cíclico del hipotálamo se da a altas concentraciones de los mismos y cuando las concentraciones de progesterona están en su mínimo.

2.2.1.2. Regulación endócrina en el macho

En el caso de los machos, el eje reproductivo está regulado por la interacción entre hipotálamo-hipófisis-testículos (Fernández Abella, 1993). La LH, la FSH y la testosterona son las principales hormonas que controlan la espermatogénesis (Steinberger y Duckett, Courot et al., Cuorot y Ortavant, Cuorot et al., citados por Fernández Abella, 1993). La LH regula las células de Leydig estimulando la síntesis y secreción de testosterona; la FSH actúa en los tubos seminíferos estimulando la espermatogénesis a través del desarrollo de los espermatocitos secundarios. La FSH estimula la secreción de la inhibina por las células de Sertoli. La inhibina inhibe la secreción de FSH a nivel de la hipófisis (Blanc y Cachoreau, Caraty, citados por Fernández Abella, 1993). Cuando aumentan los niveles de andrógenos (principalmente la testosterona), los niveles de LH y FSH disminuyen por retroalimentación negativa (Crim y Geschwind, Schanbacher, D'Occhio et al., Olster y Foster, citados por Fernández Abella, 1993). Por otro lado, las células de Sertoli ejercen un control parácrino estimulando a las células de Leydig a secretar andrógenos (Martin et al., citados por Fernández Abella, 1993) (figura 9).

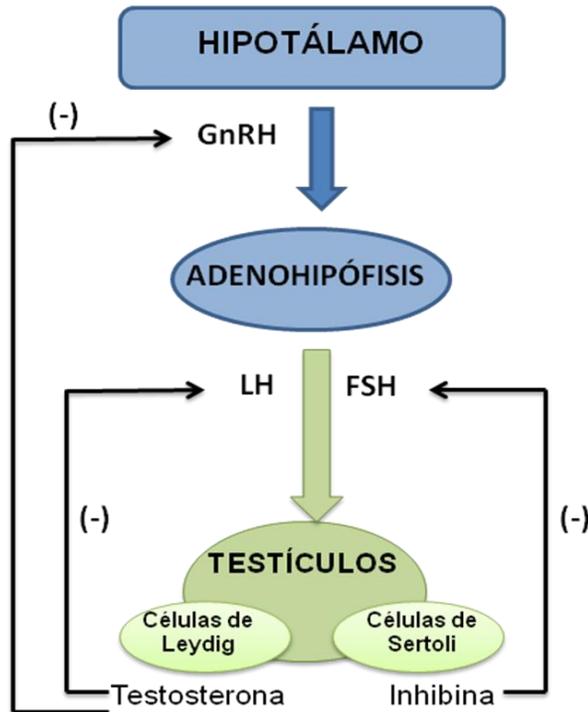


Figura 9. Control hormonal en machos.

2.2.2. Función de los esteroides sexuales

El ovario produce hormonas esteroideas: estrógenos y progesterona (McDonald y Pineda, 1991). El principal estrógeno es el 17- β -estradiol, que además de ser producido por los ovarios ha sido aislado de las adrenales, la placenta y los testículos (en cantidades insignificantes) (McDonald y Pineda 1991, Fernández Abella 1993). Sus principales funciones tienen que ver con la inducción del celo a través del control del centro de comportamiento sexual, además es responsable de inducir el pico preovulatorio de LH y la ovulación. A nivel anatómico, provoca cambios en el epitelio glandular del endometrio y cambios histológicos en la vagina, crecimiento de los conductos de la glándula mamaria y de la expulsión fetal. Por otro lado, los estrógenos permiten una

mayor eficiencia de conversión del alimento mejorando las ganancias diarias y la retención de nitrógeno (Fernández Abella, 1993).

La progesterona es sintetizada por el cuerpo lúteo principalmente, pero también es producida por placenta y las glándulas adrenales, es la hormona que regula el ciclo estral. Junto con los estrógenos, actúa en mecanismos de retroalimentación positiva o negativa en el crecimiento del epitelio glandular uterino, la glándula mamaria, transporte de gametos y embrión, gestación, y parto, e.o. (Fernández Abella, 1993). En la gestación provoca el engrosamiento del endometrio y proliferación de las glándulas uterinas antes de que ocurra la implantación del embrión, inhibe el exceso de motilidad uterina, suspende la ovulación (inhibiendo la FSH y LH), y en la glándula mamaria favorece el desarrollo de los alvéolos.

Los andrógenos son producidos por las células de Leydig de los testículos, aunque también son secretados en pequeñas cantidades por la corteza adrenal, la placenta y los ovarios. Estos son numerosos, los más importantes son: la testosterona, la dihidrotestosterona y la androstenediona (Fernández Abella, 1993). Las principales funciones de los andrógenos tienen que ver con la espermatogénesis, la supervivencia espermática y el comportamiento sexual del macho. Por otra parte favorece la retención de nitrógeno y aumenta el grosor de las fibras musculares, a través de su efecto anabólico-proteico (Fernández Abella, 1993).

2.3. EJE METABÓLICO

2.3.1. Metabolismo y las hormonas involucradas

El metabolismo es el mecanismo por el cual los sistemas vivos adquieren y utilizan la energía para llevar a cabo funciones vitales, como el mantenimiento, y la reproducción. El eje está regulado por hormonas y

metabolitos, y aquí se hará énfasis en la acción metabólica de la GH, IGF-I, insulina y leptina.

2.3.1.1. Hormona de Crecimiento (GH)

La GH es sintetizada por las células somatotropas de la adenohipófisis que están reguladas por dos péptidos hipotalámicos: por un lado la somatotropina (ST) o la hormona liberadora de la GH (GRH), y por otro lado la somatostatina (SS) o hormona inhibidora de la GH (GIH) que inhibe su liberación controlando la pulsatilidad de la hormona (Pérez Romero, 1997).

La GH es una hormona anabólica, entre sus principales funciones se encuentra la regulación del metabolismo proteico, lipídico y glucídico (Anderson, 2005) actuando a corto y mediano plazo de distinta manera: a corto plazo tiene un efecto similar al de la insulina aumentando el consumo de glucosa, la síntesis proteica y lipídica; y a mediano plazo actúa contrariamente a la insulina disminuyendo la utilización de la glucosa y aumentando la oxidación de los lípidos, provocando un aumento de la glucosa en sangre. Además aumenta el transporte de aminoácidos hacia las células y activa la transcripción y traducción formando parte de todos los procesos de síntesis proteica (Devesa, citado por Pérez Romero, 1997). También disminuye la degradación de proteínas celulares (Pérez Romero, 1997) y esta acción anabólica de la GH se manifiesta en tejidos como el hueso, el cartílago, el páncreas, el músculo y el hígado principalmente (Pérez Romero, 1997).

Además de la acción metabólica, la GH, lleva a cabo importantes funciones como la promoción del crecimiento longitudinal de los huesos, la acreción de los músculos y la homeostasis (Anderson, 2005). La acción de la GH sobre el metabolismo glucídico y lipídico tienen por objetivo la obtención de energía para lo que es su función principal: promover el crecimiento a través del aumento del tamaño celular, la estimulación de la mitosis y diferenciación

celular; la síntesis proteica también es clave para el desarrollo del crecimiento (Pérez Romero, 1997).

Las acciones de la GH son mediadas por su receptor (RGH) y las mayores concentraciones de RGH se encuentran en el hígado seguido por el tejido adiposo (Brameld et al. 1996, Edens y Talamantes 1998, Lucy et al. 1998, Lucy et al. 2000, Butler et al. 2003). Una vez secretada la GH actúa sobre los tejidos periféricos estimulando la producción de IGF-I, quien actuará como mediadora de la mayoría de los efectos de la GH, conformando juntas, el llamado eje somatotropo o eje GH-IGF-I (Pérez Romero 1997, Bondy y Zhou 2005). El principal órgano secretor de IGF-I es el hígado (Jones y Clemmons, citados por Butler et al., 2003). El hígado es el mayor órgano metabólico y endócrino, de gran importancia en la regulación del crecimiento y el metabolismo, su función principal es la regulación de la nutrición a través de la interacción de numerosas hormonas (Hyatt et al., 2007).

2.3.1.2. Factor Insulémico I (IGF-I)

Existen dos tipos de IGFs, la IGF-I y la IGF-II, pero principalmente la IGF-I es la que está bajo control metabólico (Lucy, 2008). Ambas IGF tienen una secuencia de aminoácidos muy parecida a la proinsulina (Pérez Romero, 1997). La acción de las IGFs está mediada por receptores y moduladas por proteínas de unión. Existen dos tipos de receptores, el IGF tipo-1, al que se une la IGF-I con gran afinidad, con menor afinidad la IGF-II e interactúa con la insulina; y el receptor de IGF tipo-2 al que se une la IGF-II y con menor afinidad la IGF-I (Pérez Romero 1997, Bondy y Zhou 2005). Las proteínas de unión (IGFBPs) modulan la acción de las IGFs a través de la regulación del transporte y la unión al receptor y también prolongan su vida media en la circulación (Bondy y Zhou, 2005). Estas proteínas constituyen una familia de al menos 6 proteínas siendo la más importante la IGFBP-3 que está directamente relacionada al eje somatotropo. Cada proteína de unión tiene su propia fisiología (Pérez Romero 1997, Lucy 2008).

Si bien el principal productor de IGF-I es el hígado en respuesta a la GH, muchos tejidos extra-hepáticos también expresan IGF-I, y como el IGF-1R se encuentra ampliamente distribuido en el organismo animal, se acepta que además del mecanismo endócrino, la IGF-I tiene acción autócrina/parácrina. Existe evidencia que dice que la insulina también podría facilitar la producción hepática de IGF-I junto con la GH (Hess et al., 2005).

Muchos procesos fisiológicos son afectados por la IGF-I, el crecimiento somático durante el desarrollo fetal, el crecimiento postnatal y la eficiencia de producción de especies de ganado (Bunter et al. 2005, Blair et al., Hegarty et al., citados por Afolayan et al. 2008). La IGF-I regula la secreción de GH actuando sobre el hipotálamo y la hipófisis, inhibiendo su secreción (Le Roith et al., 2001). En el hipotálamo estimula la secreción de somatostatina e inhibe la secreción de GRH (Müller, 1987), en la hipófisis -donde actúa principalmente- disminuye los niveles de ARNm de GH y la liberación de la hormona (Ceda et al., Minami et al., citados por Pérez Romero, 1997).

La expresión de los genes de RGH y de IGF-I es sensible al estado nutricional y fisiológico (Kobayashi et al., 1999), en condiciones de balance energético negativo la IGF-I se ve disminuida a pesar de la GH, ya que el hígado es incapaz de sintetizarla cuando hay insuficientes cantidades de energía y aminoácidos esenciales (Pérez Romero, 1997).

2.3.1.3. Insulina

La insulina es secretada por el páncreas y su acción principal es la de facilitar la entrada de glucosa por la membrana plasmática manteniendo los niveles de glucosa en sangre normal. Activa las enzimas de la síntesis de glucógeno en hígado y en el tejido muscular, disminuyendo así la concentración de glucosa en sangre. Se trata de una hormona hipoglucemiante que estimula procesos anabólicos incrementando la oferta de sustratos en la célula y las actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de reservas energéticas

(García Sacristán 1995, Astessiano y Bianchi 2004). Se considera la hormona clave en la regulación del crecimiento fetal y desarrollo embrionario, estimula la síntesis proteica y del glucógeno, además de regular la lipólisis.

2.3.1.4. Leptina

La leptina es sintetizada casi exclusivamente por el tejido adiposo y su síntesis está regulada por la adiposidad de forma positiva y negativamente por la desnutrición en rumiantes y otros animales (Ahima et al., Ingvartsen et al., Spiegelman et al., citados por Block, 2003), aunque el gen de leptina también está expresado en tejidos placentarios y fetales, en la glándula mamaria, estómago, músculos, etc. (Chilliard et al., 2001).

Esta hormona está involucrada en la regulación homeostática de la energía y en otras funciones fisiológicas (Chilliard et al. 2001, Block et al. 2003). Cuando su concentración en sangre es alta se produce una reducción en el consumo y aumenta el gasto energético (Henry et al. 1999, Morrison et al. 2001). Por el contrario cuando la concentración de leptina en plasma es baja durante la desnutrición, se induce el aumento del apetito, la adaptación metabólica y la conservación de energía (Schwartz et al. 1996, Ahima et al., citados por Block et al. 2003). La mayoría de sus efectos metabólicos se realizan mediante la interacción con sus receptores específicos localizados en el sistema nervioso central y en tejidos periféricos (Barb, 1999) ya que se han encontrado el ARNm de su receptor en la zona ventromedial y en el núcleo arqueado del hipotálamo y en la zona anterior de la hipófisis en ovejas (Dyer et al., citados por Barb, 1999), ratas (Schwartz et al., Zamorano et al., citados por Barb, 1999), y ratones (Tartaglia et al. 1995, Mercer et al. 1996).

2.3.2. Regulación del eje metabólico

Para explicar la regulación del eje metabólico, se parte de una situación en que el animal se encuentra en un balance energético negativo (BEN). El BEN implica que el animal se encuentre en un estado de baja alimentación, es decir, que tenga deficiencias nutricionales. En este estado, la glucosa en sangre es baja, por lo que la insulina que es una hormona hipoglucemiante disminuye su concentración en sangre en respuesta a la baja concentración de glucosa, provocando que tanto el músculo como el tejido adiposo dejen de fijar glucosa y otros nutrientes, aumentando la cetogénesis hepática y promoviendo la gluconeogénesis (Chilliard et al., 1998).

El hígado, tiene por función principal la regulación de la nutrición a través de la interacción de numerosas hormonas (Hyatt et al., 2007). El hígado produce la IGF-I en respuesta a la hormona de crecimiento (Jones y Clemmons, citados por Butler, 2003) siendo el órgano con más abundancia de RGH (Brameld et al. 1996, Edens y Talamantes 1998, Lucy et al. 1998), la expresión de los genes de RGH y de IGF-I es sensible al estado nutricional y fisiológico (Kobayashi et al., 1999). En situaciones donde los nutrientes son limitantes, el hígado no responde a la GH viéndose inhibida la síntesis de IGF-I, no existiendo retroalimentación negativa aumentando así la concentración de GH en sangre durante el BEN (McGuire et al. 1995, Chilliard et al. 1998).

La leptina producida por el tejido adiposo, es un indicador del nivel de grasa corporal al sistema nervioso central, donde inhibe el neuropéptido Y limitando el consumo; en situaciones de subnutrición la leptina en sangre es disminuida y aumenta la secreción del neuropéptido Y (Chilliard et al. 1998, Block et al. 2003). Existe evidencia que sugiere que la GH podría estar involucrada en la regulación de leptina en plasma, inhibiendo su síntesis cuando el balance energético es negativo o nulo, y estimula la síntesis cuando el balance energético es positivo (Houseknecht et al., citados por Block, 2003).

Estos cambios coordinan el metabolismo de los tejidos periféricos como son el hígado, el músculo y el tejido adiposo (Etherton y Bauman 1998, Bauman 2000) (figura 10).

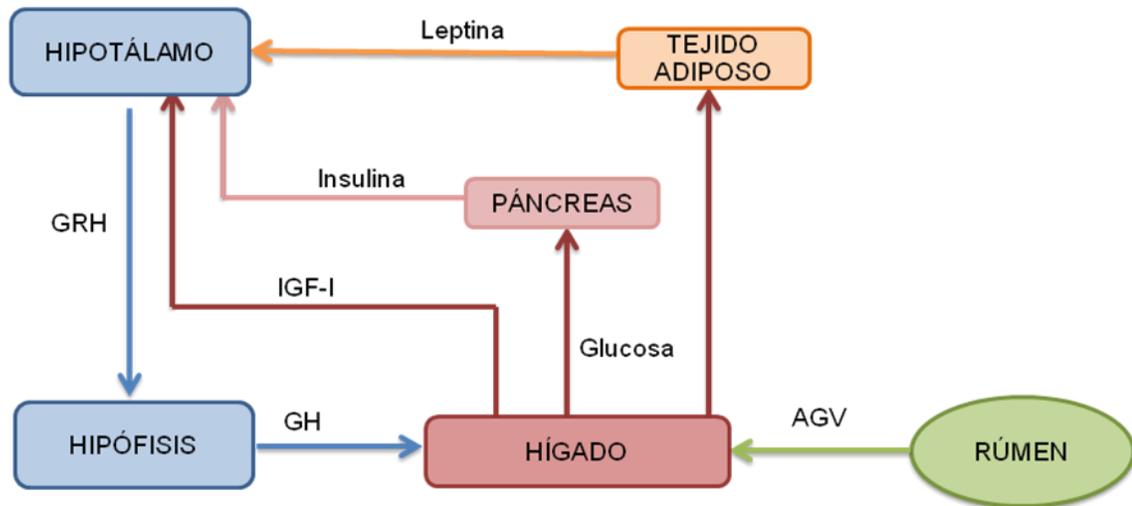


Figura 10: Representación del eje metabólico. Nota: las flechas indican efectos positivos.

2.4. INTERACCIONES ENTRE LOS EJES REPRODUCTIVO Y METABÓLICO

La importancia del estatus metabólico y/o nutricional en mantener la función reproductiva está bien establecida (Barb, 1999), sin embargo, no está bien establecida la función del eje reproductivo sobre el metabólico. A pesar de la evidencia que muestra que los esteroides sexuales afectan al eje metabólico, no hay estudios que hayan evaluado el efecto de los estrógenos y testosterona en la expresión génica de tejidos típicamente metabólicos como el hígado y el adiposo.

2.4.1. Efecto del eje metabólico sobre la reproducción

Para reproducirse, el animal debe tener energía disponible para esta función, esto depende de la energía consumida, de la almacenada en los tejidos (adiposo, hígado y músculo) y de los requerimientos para funciones que mantengan la homeostasis y el crecimiento. La diferencia entre estos aportes y requerimientos, es lo que define el “balance energético” o considerando una mayor dimensión del proceso “estatus metabólico” (Blache, 2007).

El estatus metabólico ejerce un control sobre el eje hipotálamo-hipófisis, expresándose a través de las hormonas metabólicas, algunas de estas (como la GH, IGF-I, insulina y leptina) modulan el eje reproductivo determinando la ciclicidad ovárica y alterando la secreción de las hormonas reproductivas (Meikle, 2004). Una situación de estatus metabólico negativo, es decir de desnutrición, en ovinos, puede traer distintos efectos sobre la fertilidad que se pueden clasificar en largo, mediano y corto plazo (Fernández Abella, 1993).

Los efectos de largo plazo se refieren a la situación de desnutrición que afecta el potencial genético de un individuo desde su estado fetal (Gauthier et al., Gunn, citados por Fernández Abella, 1993) y en el primer año de vida de la cordera, una situación de restricción alimenticia puede resultar en un inadecuado desarrollo corporal y afectar el crecimiento uterino (Meyer et al., citados por Fernández Abella, 1993). Los efectos de mediano plazo son los que afectan dentro de un ciclo reproductivo o en el siguiente, es decir en el plazo de un año (Fernández Abella, 1993). Estos efectos están determinados por el peso vivo y la condición corporal (Haresign, citado por Fernández Abella, 1993) ya que las pérdidas de las reservas corporales utilizadas durante la gestación y lactación determinan la tasa ovulatoria del siguiente servicio (Fernández Abella, 1993). Los efectos de corto plazo son los que actúan en el período pre-encarnerada y durante la encarnerada (Gunn, Haresign, citados por Fernández Abella, 1993) dados por el peso vivo y su variación durante este período, que definen la fertilidad y prolificidad (Coop, citado por Fernández Abella, 1993).

Existen numerosas evidencias sobre los efectos de la subnutrición en la fertilidad de la vaca, una situación de estatus metabólico negativo está relacionada al retorno de la ciclicidad ovárica, existe una alta correlación positiva entre los días que demore en lograr la primera ovulación con el tiempo que le lleve recuperar el balance energético (Butler et al., 1981). Tanto en vacas de leche como en carne, una pérdida en condición corporal (CC) en el período posparto refleja un BEN (Butler y Smith 1989, Gestido 2007, Astessiano 2010, Quintans et al. 2010, Scarsi et al. 2010), además ese BEN resulta en una menor tasa de concepción al primer servicio en vacas lecheras (Butler y Smith, 1989).

La principal causa del prolongado anestro posparto en vacas amamantando (Wettermann et al., 2003) no se debe a la falta de desarrollo folicular por un insuficiente soporte de hormona folículo estimulante (FSH), sino a una falla en la ovulación de los folículos (Griffith y Williams, 1996). Para que la ovulación se produzca es necesario que un folículo dominante sea expuesto a una correcta pulsatilidad de LH y que su capacidad de producir estradiol esté desarrollada (Roche et al., 1992). Un inadecuado estatus metabólico inhibe la secreción de GnRH por parte del hipotálamo, al aumentar la sensibilidad al feedback negativo ejercido por el estradiol (Gauthier et al., Schillo, Wetterman, citados por Fernández Abella, 1993) provocando una disminución en la secreción de LH. Se disminuye entonces la pulsatilidad de LH previniendo la maduración del folículo dominante, y no ocurre el pico preovulatorio de LH, debido a las insuficientes cantidades de estradiol.

La existencia de señales metabólicas podría explicar la respuesta del eje reproductivo al estatus nutricional. Se conoce que la acción gonadotrófica de la LH y FSH es modulada por hormonas y factores de crecimiento como la insulina, GH e IGF-I (Galvis et al., 2002). En ovinos se demostró que tanto la glucosa como esqueletos carbonados de aminoácidos o insulina e IGF-I pueden modular la tasa ovulatoria independientemente de las concentraciones de FSH, a través de efectos directos en el ovario sobre el desarrollo folicular (Jolly et al., citados por Galvis et al., 2002).

En un balance energético positivo la concentración de glucosa en sangre es alta, y en respuesta a esta situación, la concentración de insulina se ve aumentada, por lo que esta hormona es un indicador del estatus metabólico del animal. Contrariamente, cuando el balance energético es negativo, la insulina se ve disminuida (en respuesta a la baja concentración de glucosa en sangre). La insulina juega un importante rol en la respuesta del ovario a las gonadotropinas, sus receptores están presentes en las células de la granulosa y la teca, la unión de la hormona a su receptor estimula el transporte de la glucosa hacia las células, siendo la glucosa la principal fuente de energía para el ovario (Rabiee et al., citados por Viñoles, 2003). Por lo que la insulina está involucrada en la respuesta ovulatoria frente al cambio nutricional a través del estímulo del consumo de la glucosa (Dowing et al., citados por Viñoles, 2003) actuando directamente en el ovario (Webb et al., 2004). La infusión de insulina en animales con restricciones energéticas podrían incrementar el diámetro de folículo y la tasa ovulatoria (Webb et al., 2004).

Además de tener un efecto directo en el ovario, existe evidencia que indica que la insulina cumple un fuerte rol en la respuesta de la GnRH frente a cambios metabólicos (Blache et al., 2007). En ratones se demostró el rol central que cumple la insulina en el control de la secreción de la GnRH (Bruning et al., 2000). Al inyectar bajas dosis de insulina en el tercer ventrículo en carneros con restricciones alimenticias, se incrementaron los pulsos de LH a valores similares a animales bien alimentados (Miller et al., Tanaka et al., citados por Blache et al., 2007), además se demostró la presencia de receptores de insulina en el hipotálamo (Blache et al., 2002). En vacunos también se encontraron asociaciones entre la insulina y la secreción de LH (Sinclair et al., 2002). Sin embargo, a pesar de la evidencia demostrada, la insulina no siempre estimula la secreción de GnRH, especialmente en presencia de una fuerte retroalimentación negativa (Blache et al., 2007).

La IGF-I aparentemente está involucrada en todos los aspectos de la reproducción de las hembras; en el ovario, el útero, la placenta (su crecimiento y funcionamiento) y en la relación neuroendócrina existente entre el estatus

nutricional y la competencia reproductiva (Bondy y Zhou, 2005). Sin embargo en los machos no está fuertemente involucrada con los efectos de los cambios nutricionales en la reproducción (Blache et al., 2007). En una situación de BEN, la IGF-I se encuentra en un bajo nivel, lo que se asocia a los largos períodos de anestro postparto (Diskin et al., 1999). Además, junto con la insulina, estimula la esteroidogénesis y la proliferación de las células de la teca y granulosa en bovinos (Spicer et al. 1993, Spicer y Stewart 1996). En ovinos se ha sugerido que la IGF-I puede alcanzar el ovario por una vía local, dado que el estradiol folicular aumenta la síntesis de IGF-I en el útero pudiendo entonces actuar de forma endócrina afectando el desarrollo celular de los folículos (Perks et al., citados por Viñoles, 2003).

La producción de GH por la hipófisis es estimulada por la liberación de la GRH en balance energético positivo (Monget et al., citados por Blache et al., 2007). Los mayores efectos de la GH están mediados por la IGF-I, aunque existe evidencia de la presencia de receptores de GH en el ovario lo que indicaría la posible acción directa de la hormona (Bondy y Zhou, 2005). Sin embargo, en carneros el balance energético no parece estar involucrado en la secreción de GnRH porque un incremento en la nutrición disminuye la concentración de GH en plasma (Miller et al., citados por Blache et al., 2007).

La leptina producida por los adipocitos actúa sobre el eje reproductivo informando si existe suficiente reserva corporal disponible para cubrir las demandas calóricas de la reproducción (Meikle et al., 2001), su concentración en plasma varía con cambios bruscos en la nutrición y está asociada con la gordura de la oveja (Viñoles, 2003). La expresión y liberación de leptina, y la sensibilidad de las gónadas y los tejidos cerebrales a la leptina, son alteradas por los cambios de corto y largo plazo del estatus metabólico. Numerosos experimentos en hembras y machos ovinos han mostrado que la leptina puede afectar el sistema neuroendócrino que controla la actividad del eje reproductivo (Adam et al., Chilliard et al., citados por Blache, 2007).

Tanto leptina como IGF-I explican el desempeño reproductivo como señales endócrinas que le indican al eje el balance energético. La leptina actúa

en el sistema nervioso central a través de la regulación del neuropéptido Y (NPY) regulando el apetito y el metabolismo, es decir disminuye el consumo voluntario y aumenta la tasa metabólica general y los niveles de actividad (Barash et al. 1996, Hamann y Matthaei 1996, Haynes et al. 1998). A pesar de que la leptina actúa a través de la GnRH, incrementando los niveles de LH y FSH, no se puede descartar su acción directa en el ovario (Spicer, citado por Viñoles, 2003), ya que existen receptores de la hormona en las células de la granulosa y de la teca del ovario bovino (Liefers, 2002). Otros estudios demostraron la acción de la leptina como modulador de la esteroidogénesis (Barb, 1999), apoyando la idea del efecto directo de la hormona sobre la función ovárica. La concentración de leptina en sangre se incrementa durante el desarrollo de la pubertad o durante el intervalo posparto, entonces, los niveles de leptina en plasma podrían indicar algún umbral de estimulación que permita la activación del eje reproductivo, podría ser la señal de los adipocitos que une el eje reproductivo con el tejido adiposo (Barb, 1999).

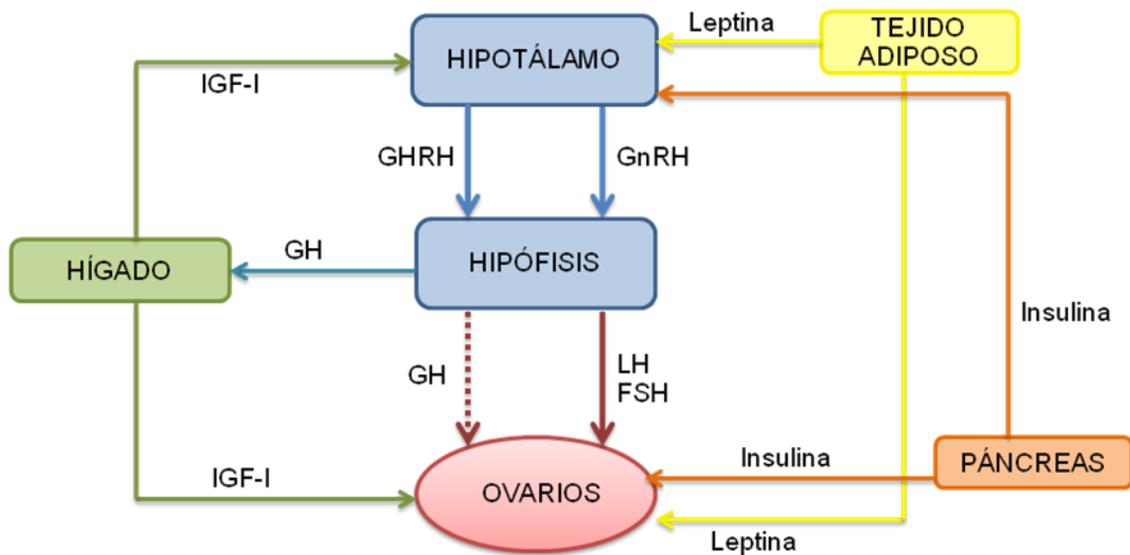


Figura 11: Diagrama que muestra donde actúan algunas de las hormonas metabólicas a nivel del eje reproductivo. Nota: las flechas indican efectos

positivos, la flecha punteada indica un mecanismo de regulación en el cual se supone su existencia.

2.4.2. Efecto del eje reproductivo sobre el metabolismo

A pesar de no haber estudios específicos que evalúen el efecto de estrógenos y testosterona en tejidos metabólicos típicos, sí existe evidencia que demuestra un efecto directo de los esteroides sexuales sobre el metabolismo.

Estudios recientes han demostrado una interacción entre los ejes sexual-reproductivo y metabólico a nivel central. Los esteroides sexuales regulan el eje somatotrópico a nivel del hipotálamo donde están presentes RE de manera importante, regulando el consumo y reserva de energía (Musatov et al., citados por Della Torre, 2011). Además, los niveles de esteroides sexuales circulantes influyen en la respuesta de las neuronas a las hormonas metabólicas centrales, lo cual lleva a pensar que existe un mecanismo central de control de la energía metabólica a partir de las hormonas sexuales (Schneider, citado por Della Torre, 2011). Otros autores (Giovambattista et al., 2008) también sostienen que las hormonas sexuales actúan a través del hipotálamo sobre el control de la ingesta alimentaria y el balance de energía (Hamann y Matthaei, citados por Giovambattista et al., 2008), implicando al estradiol en la regulación directa de la ingesta de alimento (Kalra et al., citados por Giovambattista et al., 2008), explicado por la presencia de receptores específicos en las regiones del hipotálamo donde están presentes neuronas productoras del neuropéptido Y (Sar et al., citados por Giovambattista et al., 2008).

Los estrógenos forman parte en la regulación de la expresión del sistema IGF -como se ha demostrado en bovinos- (Meikle et al., 2001). También regulan positivamente la síntesis de leptina, mientras que los andrógenos la inhiben (Carrascosa y Yeste, Halleux et al., Nedvidkova, Remesar et al., Trayhurn et al., citados por Astessiano y Bianchi, 2004). La

expresión endometrial del ARNm de RGH e IGF-I en vaquillonas es mayor en fases iniciales del ciclo estral mientras que la abundancia de IGF-II e IGF-1R fue máxima al día 12. Estos resultados muestran que los componentes del eje GH-IGF están regulados de forma diferencial durante el ciclo estral, sugiriendo un rol de los esteroides sexuales en esta regulación (Meikle et al., 2001). Andrógenos y estrógenos, incrementan el crecimiento muscular en numerosas especies. Implantes de acetato de trenbolona y estradiol, incrementan la expresión de ARNm de IGF-I en músculo de novillos e hígado de corderos (Johnson et al., 1998).

En ratas ovariectomizadas los estrógenos pueden incrementar la producción de leptina (Brann et al., 1999) mientras que en vaquillonas ovariectomizadas, los estrógenos incrementan la expresión de transcritos del receptor de leptina (RLEP) en varios tejidos pero no la concentración plasmática de leptina ni la expresión de ARNm de leptina en el tejido adiposo (Thorn et al., 2007). La concentración de leptina en sangre tampoco se incrementó en ovejas ovariectomizadas tratadas con estrógenos o progesterona (Kadokawa, 2006). La preñez temprana (día 14) aumenta la expresión de ARNm de leptina en tejido adiposo en ovejas bien alimentadas (Sosa et al., 2008).

Los esteroides sexuales pueden actuar centralmente regulando la secreción de GH o periféricamente modulando la respuesta a la GH. También pueden regular la secreción de GH directamente o indirectamente a través de la modulación de IGF-I (Meinhardt et al., 2006). La testosterona estimula la secreción de GH centralmente (dependiente de su aromatización a estrógeno en el sistema nervioso central. El estrógeno estimula la secreción de GH indirectamente al reducir inhibición por la retroalimentación de la IGF-I (Meinhardt et al., 2006).

En otros estudios se encontró un claro dimorfismo sexual, tanto en hombres como en ratas, en la secreción espontánea de GH que se manifiesta a partir de la pubertad (Rose et al., Tannenbaum et al., citados por Pérez Romero, 1997). Este dimorfismo sexual es resultado de la acción de los esteroides sexuales durante el período neonatal y adulto (Chowen et al., citados

por Pérez Romero, 1997); el estradiol reduce los niveles de GRH en el hipotálamo e inhibe la somatostatina, mientras que la testosterona activa la liberación de somatostatina e incrementa los niveles de GRH (Chowen et al, Devesa et al., citados por Pérez Romero, 1997). Por lo tanto en machos altos niveles de testosterona generan pulsos de GH separados y de elevada amplitud, en el caso de las hembras que tienen menor concentración de GRH y menor efecto de la somatostatina los picos de GH son más frecuentes pero de menor amplitud (Pérez Romero, 1997). Esta diferencia en la secreción de GH entre sexos genera otro tipo de dimorfismos como el crecimiento somático, la inducción enzimática en el hígado o el metabolismo lipídico, en machos los picos de GH de gran amplitud y separados por nadires generan un mayor efecto sobre el crecimiento que las pulsaciones de GH más continuadas generadas en las hembras (Pérez Romero, 1997).

También se ha observado dimorfismo sexual en la concentración de IGF-I en ovinos (Medrano et al., Morel et al., Roberts et al., citados por Afolayan y Fogarty, 2008) y vacunos (Davis et al., Kerr et al., citados por Pérez Romero, 1997), teniendo los machos mayor concentración hormonal que las hembras. Se ha encontrado evidencia que explica que la IGF-I está en parte regulada por esteroides sexuales, insulina y hormonas tiroideas, por lo que el cambio de los niveles circulantes de los esteroides sexuales durante la pubertad podría explicar el incremento de los niveles circulantes de la IGF-I durante la pubertad (Pérez Romero, 1997).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN

El experimento fue realizado en la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía Salto (EEFAS), en el mes de mayo del año 2007. Ubicada en el kilómetro 21 de la ruta 31, en la tercera sección judicial del departamento de Salto, Uruguay (31°23´ latitud sur; 57°57´ longitud oeste). La estación experimental comprende 1019 hectáreas de superficie total con un Índice Coneat promedio de 92.

3.2. ANIMALES

Se utilizaron 16 ovinos de la raza Corriedale de diferente procedencia, de los cuales 8 eran ovejas adultas ovariectomizadas y ocho eran carneros orquiectomizados. En el cuadro 2 se muestra el peso vivo (PV) y la condición corporal (CC) de los animales.

Los carneros fueron orquiectomizados con más de 5 meses previo al comienzo del experimentos, en cuanto a las ovejas, dos fueron ovariectomizadas en el año 2005 y las restantes 6 entre 3 y 7 semanas previas al comienzo del experimento. La gonadectomización se realizó bajo efecto de xilacina 2% (0,5 mL im) con infiltración de anestésico local (lidocaína al 2%, 5 mL sc). El experimento fue realizado de acuerdo a las recomendaciones de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República y el protocolo de experimentación fue aprobado por la CHEA (No. 7101/07). Los animales se encontraban hasta la tarde previa al comienzo del estudio en campo natural con libre acceso de agua.

Cuadro 2. Peso vivo (kg) y condición corporal promedio para carneros y ovejas antes del sacrificio.

GRUPO	Peso vivo (\pm EEM)	Condición Corporal (\pm EEM)
Carneros	70,6 (\pm 2,8)	3,6 (\pm 0,19)
Ovejas	41,5 (\pm 2,3)	3,2 (\pm 0,20)

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para cada sexo se formaron dos grupos (control y tratado con esteroides sexuales) tomando en cuenta el momento de gonadectomía y el peso vivo. Cuatro ovejas recibieron 0,1 mL de Benzoato de Estradiol (BE) im (5 mg/mL en vehículo oleoso, Laboratorio Dispert S.A., Montevideo, Uruguay) y cuatro carneros recibieron 1 mL de Ciclopentilpropionato de Testosterona (CT) im (100 mg/mL en vehículo oleoso, Laboratorio Dispert S.A., Montevideo, Uruguay).

Se tomaron muestras de sangre a las 12, 24, 48 y 72 horas. La sangre fue centrifugada dentro de la hora de colectada y se guardó el plasma a -20°C hasta su análisis por RIA, donde se midió estradiol en hembras y testosterona en machos. Luego de la última muestra de sangre se procedió al sacrificio de los animales para recuperar muestras de hígado y grasa perirrenal que se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C para su posterior análisis. En la figura 13 se muestra un esquema del diseño experimental.



Figura 12. Representación esquemática del diseño experimental. La hora 0 corresponde a las 7 am. BE = Benzoato de Estradiol; CT = Ciclopentilpropionato de Testosterona.

3.4. VARIABLES ANALIZADAS

Para las muestras de hígado se analizaron los transcritos de los receptores de estrógeno ($RE\alpha$), de la hormona de crecimiento (RGH), de la insulina (RI), y de la leptina (RLEP), así como el transcrito del factor de crecimiento tipo insulémico-I (IGF-I). Para las muestras de grasa perirrenal se analizaron las mismas variables además el transcrito del receptor de andrógenos (RA).

Para el análisis de las muestras, se extrajo ARN total de las mismas usando TRIZOL (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA), precipitado con LiCl para remover inhibidores de la síntesis de ADNc y tratado con ADNasa para remover ADN contaminante (Naderi et al., 2004). La concentración de ARN se determinó por absorbancia a 260nm, la pureza de todos los aislados de ARN fue evaluado a partir de la tasa de absorbancia 260/280 y la integridad por electroforesis (gel de agarosa 1%). Todas las muestras presentaban $A_{260/280}$ entre 1.8 y 2.0.

Para cada muestra se sintetizó ADNc por la reacción de transcripción reversa (RT) usando SuperScript III First-Strand Sintesis System Kit (Invitrogen,

Carlsbad, CA) con primers no específicos y 1 µg de ARN total como modelo. Los primers para amplificar específicamente el ADNc de RE α , RA, RGH, IGF-I, RI y RLEP fueron obtenidos de la literatura, así como los genes housekeeping HPRT (usado para las muestras de hígado y adiposo) y RPL19 (usado para las muestras de adiposo) (Schams et al. 2003, Myers et al. 2005, Chen et al. 2006, Jaquierey et al. 2006, Carriquiry et al. 2008).

En base al ADNc se midió la abundancia de transcriptos usando RT-PCR en tiempo real en un Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia) usando SYBR-Green (Quantimix; Biotools, Madrid, España) y primers diseñados específicamente para los genes de interés (RE α , RA, RGH, IGF-I, RI y RLEP) y para los genes de control interno (HPRT y RPL19). Como control positivo y negativo se utilizaron una muestra calibradora (un pool de seis animales pertenecientes al experimento) y agua, respectivamente. Para cada gen para cada animal se determinó el número de ciclos requeridos para alcanzar el umbral (C_T). Para estandarizar las medidas de cuantificación de expresión génica debido a diferencias en la cantidad de células extraídas de cada muestra de tejido, en la calidad del ARN, y en la eficiencia de la RT, los datos de expresión de ARNm de cada gen de interés fueron normalizados respecto a los genes usados como controles internos ($\Delta C_T = [C_T$ (genes de interés) - C_T (gen control)] de los que se usó la media geométrica), y fueron expresados entonces en relación a la muestra de control positivo ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T - \Delta C_T$ [control positivo], cuantificación relativa (Livak y Schmittgen, 2001).

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa Statistical Analysis System (del SAS Institute). Se realizó un análisis de varianza de los datos del hígado y tejido adiposo usando el procedimiento MIXED. Los dos efectos principales que se estudiaron fueron sexo (macho o hembra) y tratamiento anidado en el sexo como efectos fijos (con o sin reemplazo de esteroide sexual). Las variables analizadas fueron las

abundancias relativas de ARNm de $RE\alpha$, RGH, IGF-I, RI, RLEP en hígado, y en tejido adiposo además se analizó la abundancia de RA. El nivel de significancia considerado fue $P < 0,05$, y para tendencia $P < 0,1$.

4. RESULTADOS

4.1. TESTOSTERONA Y ESTRADIOL

Al inicio del tratamiento (hora 0) el nivel de estradiol promedio para las hembras fue de 13.3 pmol/L, mientras que en machos no se pudo detectar testosterona en plasma. Los tratamientos con esteroides sexuales efectivamente lograron aumentar las concentraciones de estradiol y testosterona (figura 14).

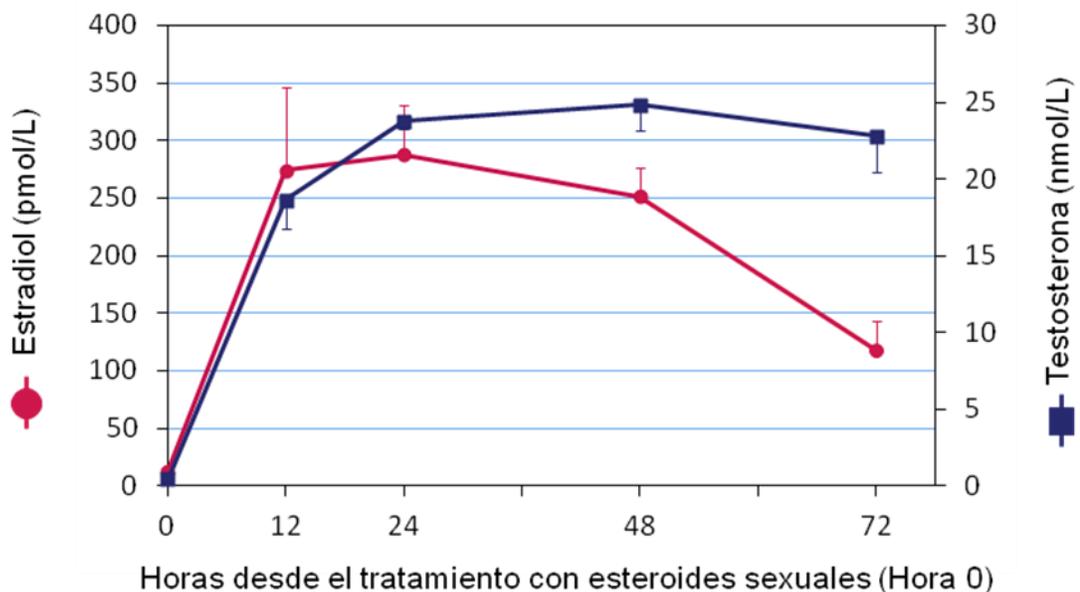


Figura 13. Nivel de estradiol (pmol/L, \pm EEM) y testosterona (nmol/L, \pm EEM) en plasma de animales tratados, durante las 72 horas post inyección de Benzoato de Estradiol (ovejas) y Ciclopentilpropionato de Testosterona (carneros).

4.2. EXPRESIÓN RELATIVA DE GENES CONTROL: HPRT Y RPL19

Los efectos del tratamiento con esteroides y del sexo, no afectaron la cantidad relativa de transcritos de los genes control en muestras de hígado y de tejido adiposo (Cuadro 3).

Cuadro 3. Valores de P para los efectos de sexo y tratamiento, su interacción y los contrastes entre los grupos para los genes control de hígado y tejido adiposo.

Efecto	TEJIDO ADIPOSO		HÍGADO
	HPRT	RPL19	HPRT
Sexo	0.3846	0.4711	0.3327
Tratamiento (Sexo)	0.1232	0.1662	0.4331
OVX – OVX+BE	0.4933	0.6509	0.2284
OVX – TX	0.4662	0.4826	0.1496
OVX – TX+CT	0.2531	0.2420	0.2742
OVX+BE – TX	0.9664	0.9497	0.7835
OVX+BE – TX+CT	0.0732	0.1716	0.9011
TX – TX+CT	0.0564	0.0714	0.6907

4.3. EXPRESIÓN RELATIVA DE TRANSCRIPTOS EN HÍGADO

El cuadro 4 muestra los valores P de los efectos principales y su interacción, para cada uno de los genes transcritos. Las abundancias relativas de ARNm de los genes estudiados se muestran en la figura 15. El sexo tendió a afectar la expresión relativa del receptor RE α . Las hembras tendieron a presentar mayor expresión de ARNm de RE α que los machos, mientras la administración de esteroides (BE y CT en hembras y machos, respectivamente), disminuyó la expresión relativa de ARNm de RE α en ambos sexos. Las hembras sin tratamiento mostraron mayor expresión relativa que las hembras y los machos tratados. La expresión relativa del ARNm de IGF-I, al igual que la del ARNm de RE α , se vio significativamente disminuida por el tratamiento con esteroides. La expresión de ARNm de RI y RLEP no difirió entre sexos ni tratamientos, sin embargo hubo una tendencia de diferencia de la expresión de ARNm de RI entre ovejas con y sin BE.

Cuadro 4. Valores de P para los efectos sexo y tratamiento, su interacción y los contrastes entre grupos para cada uno de los transcritos de los genes RE α , RGH, IGF-I, RI y RLEP, en muestras de hígado.

EFFECTOS	RE α	RGH	IGF-I	RI	RLEP
Sexo	0.0595	0.4531	0.1587	0.5904	0.1453
Tratamiento	0.0392	0.2935	0.0263	0.1844	0.2235

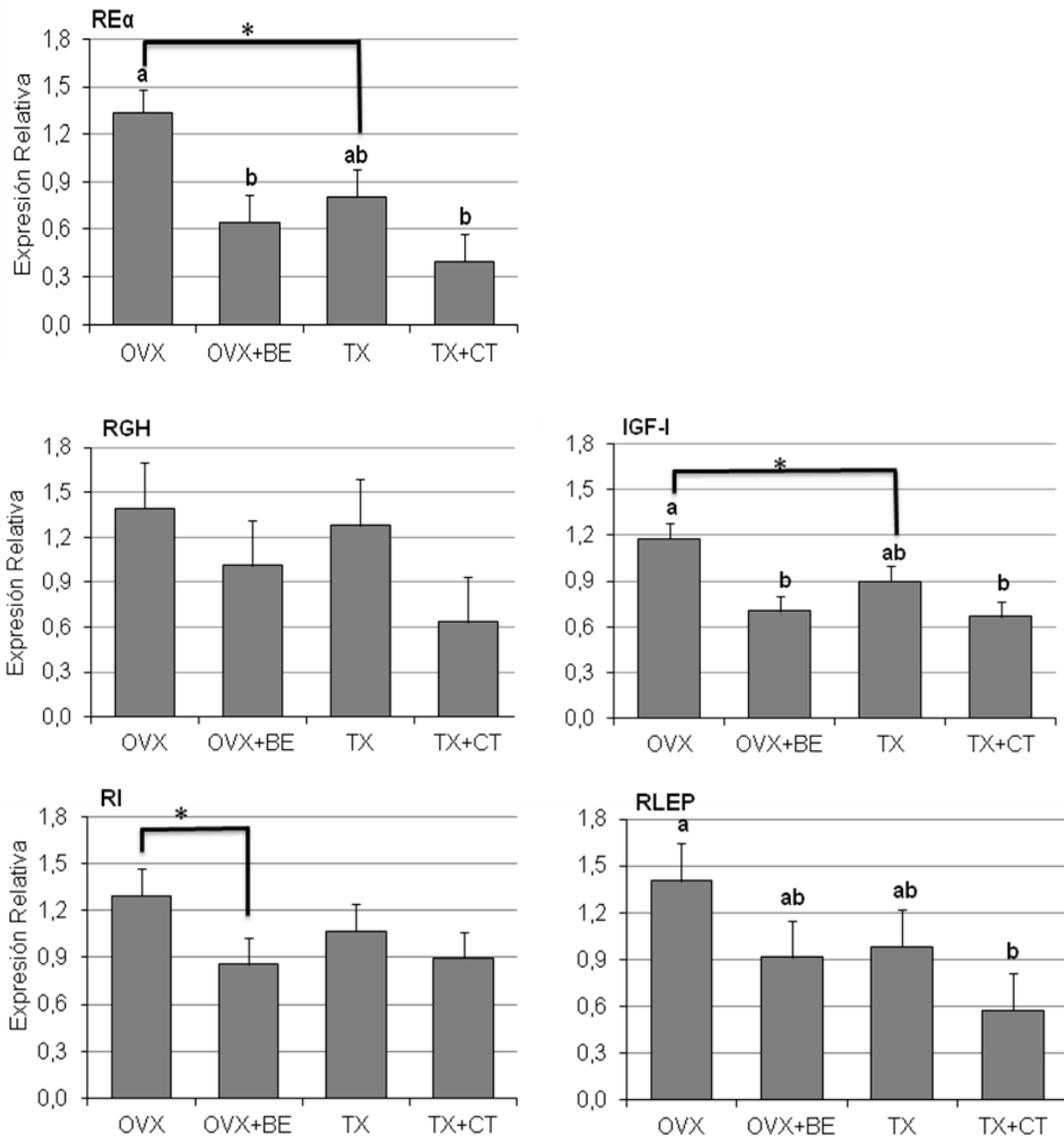


Figura 14. Expresión relativa de los genes RE α , RGH, IGF-I, RI y REPL en hígado de ovinos gonadectomizados con o sin remplazo de esteroides sexuales (OVX: ovejas ovariectomizadas; OVX+BE: ovejas ovariectomizadas con Benzoato de Estradiol; TX: carneros orquiectomizados; TX+CT: carneros orquiectomizados con Ciclopentilpropionato de Testosterona). Letras diferentes (a,b) indican diferencias significativas ($P < 0,05$), asteriscos (*) indican tendencia ($P < 0.1000$).

4.3. EXPRESIÓN RELATIVA DE TRANSCRIPTOS EN ADIPOSO

En el cuadro 5 se muestran los valores P de los efectos principales y su interacción, para cada uno de los transcritos de los genes. Las abundancias relativas de los transcritos de los genes se muestran en la figura 16. El sexo y el tratamiento hormonal afectaron significativamente la expresión relativa del ARNm de RA. Las hembras con tratamiento mostraron mayor expresión relativa del gen que los demás grupos.

Cuadro 5. Valores de P para los efectos sexo y tratamiento, su interacción y las comparaciones de grupos para cada uno de los transcritos de los genes RE α , RA, RGH, IGF-I, RI y RLEP, en muestras de tejido adiposo.

EFFECTOS	REα	RA	RGH	IGF-I	RI	RLEP
Sexo	0.4120	0.0394	0.9445	0.1391	0.4994	0.8298
Tratamiento (Sexo)	0.6614	0.0140	0.5967	0.1794	0.3578	0.3686

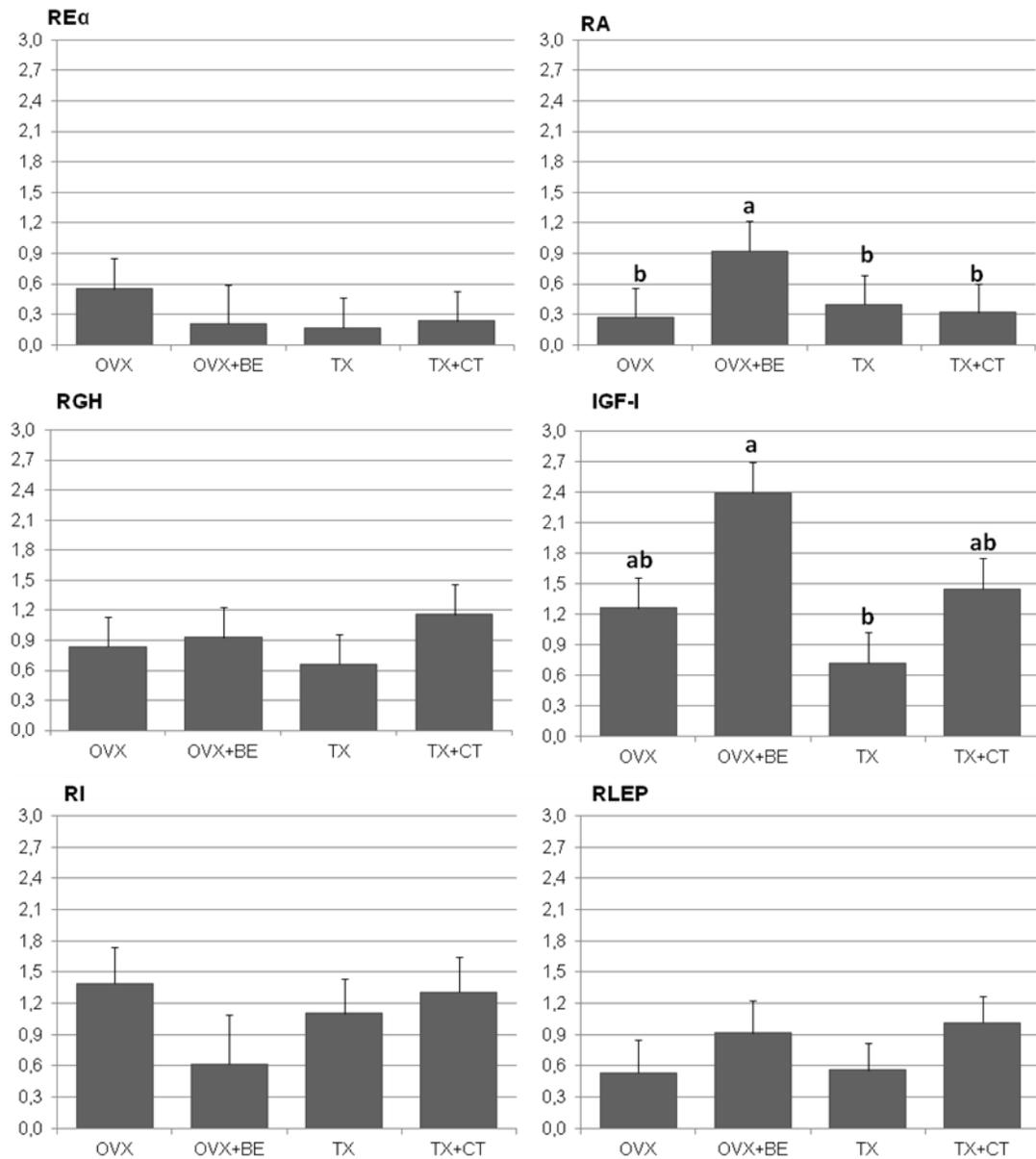


Figura 15. Expresión relativa de los genes RE α , RA, RGH, IGF-I, RI y RLEP en tejido adiposo de ovinos gonadectomizados con o sin remplazo de esteroides sexuales (OVX: ovejas ovariectomizadas; OVX+BE: ovejas ovariectomizadas con Benzoato de Estradiol; TX: carneros orquiectomizados; TX+CT: carneros orquiectomizados con Ciclopentilpropionato de Testosterona). Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).

5. DISCUSIÓN

Los tratamientos con esteroides sexuales incrementaron los niveles hormonales, tanto en machos como en hembras, confirmando el éxito del tratamiento. Las concentraciones de estradiol en las ovejas ovariectomizadas tratadas con BE correspondieron a niveles farmacológicos, aunque los niveles fueron inferiores a los obtenidos por Carbone y de Larrobla (2005), autores que fueron tomados como referencia para ajustar la dosis de BE. El tratamiento con CT incrementó la concentración de testosterona en los carneros orquiectomizados, logrando una concentración estable en sangre constante de niveles fisiológicos, sin embargo sin la pulsatilidad que ocurre en condiciones naturales.

Para un tejido específico, la concentración de la proteína del RE α , es el mayor factor indicador de la acción del estrógeno sobre el mismo (Zou e Ing, 1998). Sin embargo, la determinación del ARNm del RE α es un indicador indirecto de la presencia del receptor en el tejido en estudio. Los resultados confirman para el ovino la expresión de ARNm del RE α en hígado y grasa perirrenal y la expresión de ARNm de RA solo en grasa perirrenal ya que no fue evaluado en las muestras de hígado. La presencia de RE α y RA en hígado se ha observado en humanos, ratas, mamíferos y otros modelos animales (Roy et al. 1974, Erikson et al. 1982, Eisenfeld y Aten 1987, Song et al. 1991, Takeda et al., Simpson et al., Gao et al., citados por Della Torre et al. 2011). También existe evidencia convincente de la presencia de RE α y RA en tejido adiposo en humanos, ratas, ratones y ovinos (Mayes y Watson, 2004). Como era de esperar, en los dos tejidos se expresaron los ARNm de los genes de RGH, IGF-I, RI y RLEP. Las mayores concentraciones de RGH se encuentran en primer lugar en el hígado, y en segundo lugar en el tejido adiposo (Brameld et al. 1996, Edens y Talamantes 1998, Lucy et al. 1998, Lucy et al. 2000, Butler et al. 2003). La GH actúa indirectamente a través de la IGF-I, por lo que el principal órgano secretor de la misma es el hígado (Jones y Clemmons, citados por Butler et al., 2003). En ovinos, el RI se expresa en los adipocitos (Vernon et al., citados por

Astessiano y Bianchi, 2004), además se ha demostrado la presencia de RI en el hígado y tejido adiposo de ratones (Watanabe et al., 1998). Los RLEP en ovinos están expresados en muchos tejidos, expresándose en el tejido adiposo y otros tejidos periféricos (Dyer et al., citados por Chlliard et al., 2001), en ratas y bovinos se demostró la presencia de RLEP en el hígado (Trayhurn et al., citados por Simón y Del Barrio 2002, Thorn et al. 2007).

El metabolismo hepático es diferente en hembras y machos en roedores (Crabb y Roepke, 1987) y en mamíferos (Della Torre et al., 2011), pues existe un dimorfismo sexual en la secreción de la GH a partir de la hipófisis, por lo que el sexo sería un determinante importante en el funcionamiento del hígado; importantes factores de transcripción para el metabolismo energético se expresan distinto en hembras y machos. La isoforma del RE que se expresa en el hígado es la RE α , responsable de la diferenciación sexual y reproductiva en las hembras (Della Torre et al., 2011), lo cual coincide con los resultados obtenidos, ya que la expresión relativa del RE α en hígado tendió a ser mayor en las hembras.

En el tejido adiposo en humanos y ratas se ha demostrado la fuerte influencia que tienen los esteroides sexuales sobre el mismo, tanto los femeninos como masculinos regulan el metabolismo del tejido adiposo a través de sus receptores (Björntorp, 1997). En machos, la testosterona estimula la lipólisis mediante los RA, que son además regulados positivamente por la propia hormona. Parecería que los estrógenos tienen efectos similares a la testosterona en ratas y humanos (De Pergola et al., citados por Björntorp, 1997). En hembras –tanto en ratas como en mujeres– si bien también hay presencia de RA en el tejido adiposo, los efectos de la testosterona en el tejido no son los mismos que en los machos, pues la completa sustitución del mecanismo lipolítico después de una ovariectomía, se puede lograr con estrógeno, pero no con testosterona (De Pergola et al., citados por Björntorp, 1997). Los RA estarían regulados negativamente por los estrógenos (Li y Björntorp, citados por Björntorp, 1997), otros estudios han demostrado que los esteroides sexuales están involucrados en el metabolismo, en la acumulación y

distribución del tejido adiposo (Mayes y Watson, 2004). Entonces, en machos, la testosterona junto con la GH previene la acumulación de lípidos y estimula su movilización a través de RA, que están regulados por la testosterona, principalmente en los tejidos viscerales donde la abundancia de RA es mayor que en otras regiones, el efecto general sería disminuir la deposición de grasa visceral (Björntorp, 1997). El efecto de la testosterona en el tejido adiposo en hembras es el contrario, acumulación de grasa visceral (Björntorp, 1997). Estudios más recientes, coinciden con lo concluido anteriormente, dictando simplemente, que los andrógenos bloquean la adipogénesis (Singh et al., citados por Giovambattista et al., 2008) y que los estrógenos la estimulan (Roncari y Van, citados por Giovambattista et al., 2008). Para los resultados obtenidos se observa el efecto del sexo en la expresión relativa de ARNm de RA, sin embargo no hay efecto del sexo para el ARNm de RE α . Si bien los resultados muestran un efecto del tratamiento con esteroides sexuales en el tejido adiposo para el transcripto RA, los efectos no coinciden completamente con la bibliografía citada, pues el tratamiento con BE aumentó la expresión del ARNm de RA en las hembras y no se vio ningún efecto en el tratamiento con CT en los machos. No existió un efecto para el transcripto de RE α en el tejido adiposo.

Por otro lado, en el hígado, el tratamiento afectó la expresión de RE α e IGF-I. El estrógeno es el principal estimulador de la expresión del gen del RE α en los tejidos reproductivos de los mamíferos (Zou e Ing, 1998). Durante la fase preovulatoria el estrógeno aumenta la expresión del gen del RE α en el endometrio en todas las hembras de las especies mamíferas incluyendo la oveja (Lessey et al., Mirando et al., citados por Zou e Ing 1998, Van Lier et al. 2006). En el hígado, al contrario de lo que ocurre en el endometrio, el tratamiento con BE disminuyó la expresión relativa del ARNm del RE α , lo cual coincide con otros estudios que han demostrado que en hígado los estrógenos regulan negativamente la expresión del RE α , en ovejas tratadas con estradiol (Zou e Ing, 1998) y en ratas (Erikson, 1982). Desde otro punto de vista, otros estudios demostraron en ratas adultas, que los niveles de RE en hígado aumentan luego de una gonadectomía tanto machos como hembras (Dickson y

Eisenfeld, 1979). Otros estudios también indicaron que el metabolismo del estrógeno en el hígado reduce su receptor (Eisenfeld y Aten, 1987). Implantes de acetato de trenbolona y estradiol incrementaron la expresión del ARNm de IGF-I en hígado de corderos (Johnson et al., 1998), lo que no condice con los resultados obtenidos, dado que el tratamiento disminuyó en hígado la expresión de la IGF-I al igual que el RE α . Sin embargo, en el presente trabajo no se utilizaron corderos sino machos adultos, en el primer caso son animales que están en activo crecimiento con mayores niveles de GH y como consecuencia de IGF-I. A su vez, entre sexos sin tratamiento, los machos tendieron a expresar menos estos dos transcritos en el hígado, con respecto a las hembras. Hubo una tendencia a disminuir la expresión de ARNm del RI en las muestras de hígado de las hembras tratadas con BE con respecto a las hembras sin tratamiento, lo que coincide con trabajos realizados en ratas (González et al., 2001). En ratas ovariectomizadas, donde se evaluó el efecto de distintos niveles de estradiol en sangre sobre RI, se observó que altos niveles de la hormona, provocaron una disminución en los RI en hígado y tejido adiposo, disminuyendo la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina, evitando que se reserve energía, frente a menores niveles de estradiol, los RI aumentan y la situación se revierte, reservando energía en los tejidos periféricos (González et al., 2001).

De esta manera, la hipótesis planteada que dicta que los esteroides sexuales, como estrógenos y andrógenos, tienen un efecto en la expresión génica de tejidos típicamente metabólicos, es confirmada con los resultados obtenidos, a pesar de no conocer la forma en que interactúan específicamente las hormonas sexuales con los tejidos metabólicos estudiados, sí se puede confirmar que la interacción periférica entre el eje sexual-reproductivo y el eje metabólico en ovinos, existe.

6. CONCLUSIONES

Los tratamientos con esteroides sexuales de reemplazo fueron efectivos, incrementando los niveles hormonales, tanto en hembras como en machos. Se comprobó la expresión de los genes en estudio tanto en muestras de hígado, como en las de grasa perirrenal.

Además se concluye que los esteroides sexuales:

- Regularían la concentración de ARNm de sus receptores en hígado y en el tejido adiposo
- Podrían modular el eje metabólico a través de la regulación de la transcripción de IGF-I
- Podrían regular la sensibilidad de la insulina en hígado a través de la modificación de la expresión génica

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se puede confirmar la hipótesis inicial que dicta que estrógenos y andrógenos tiene algún efecto en la expresión génica en tejidos típicamente metabólicos, pues en base a los resultados analizados, se concluye que existe algún tipo de interacción periférica entre el eje sexual-reproductivo y el eje metabólico en ovinos.

7. RESUMEN

Se determinó el efecto de los esteroides sexuales en la expresión de genes relacionados con el eje GH-IGF en hígado y tejido adiposo, en ovinos. Se utilizaron ovejas (n=8) y carneros (n=8) Corriedale gonadectomizados. A cuatro hembras se administró 0.5 mg de Benzoato de Estradiol im y a cuatro machos 100 mg de Ciclopentilpropionato de Testosterona im, y 72 h después se tomaron muestras de hígado y tejido adiposo de todos los animales. Se extrajo ARN total de estas muestras, se sintetizó ADNc y se midió la abundancia relativa de transcritos usando RT-PCR en tiempo real y se analizó su expresión, de acuerdo a sexo y tratamiento, usando el PROC MIXED. En hígado se determinaron los transcritos de los receptores de la hormona de crecimiento (RGH), leptina (RLEP), estrógeno (RE α), insulina (RI), y el factor de crecimiento tipo insulémico-I (IGF-I), y la hipoxantina fosforibosiltransferasa (HPRT) fue usado como control endógeno. En grasa se analizaron los mismos transcritos, y además el del receptor de andrógenos (RA), y como control endógeno además del HPRT se utilizó la proteína ribosomal R19 (RPL19). La abundancia de los transcritos de los genes control no fueron diferentes entre sexos ni entre tratamientos, tanto en hígado como en tejido adiposo. El sexo tendió a afectar la abundancia relativa (AR) de RE α en el hígado (P=0.0595), y afectó la AR del RA en tejido adiposo (P=0.0394). El tratamiento afectó la AR de RE α (P=0.0392) e IGF-I (P=0.0263) en hígado y en tejido adiposo afectó la AR de RA (P=0.0140). La expresión hepática de ARNm de RE α fue mayor en hembras que en machos y los animales tratados (ambos sexos) presentaron o tendieron a presentar menor expresión de RE α e IGF-I. La expresión adiposa de ARNm de RA y de IGF-I fue mayor en hembras tratadas que en los demás animales. Ni el sexo ni el tratamiento hormonal afectaron la expresión de ARNm de RGH, RI y RLEP en hígado y tejido adiposo, y de RE α en adiposo. Los esteroides sexuales parecen regular la transcripción de sus receptores tanto en hígado y tejido adiposo y parecen tener un efecto sobre el eje metabólico a través de la IGF-I.

Palabras clave: Ovinos; Endocrinología; Reproducción; Metabolismo; RE α ; RA; RGH; IGF-I; RI; RLEP; Hígado; Tejido adiposo.

8. SUMMARY

We evaluated the effect of sex steroids on the expression of genes related to the somatotrophic axis in liver and adipose tissue in sheep. Gonadectomized ewes (n=8) and rams (n=8) were used. Four ewes received 0.5 mg of Oestradiol Benzoate im, and four rams received 100 mg of Testosterone Cyclopentilpropionate im. Animals were slaughtered 72 h after treatment and liver and adipose tissue samples were taken, frozen and stored until analysis. Total RNA was extracted from each sample and cDNA was synthesized. Quantification of the transcripts was determined by real time RT-PCR. Analysis of variance of the data was done using the MIXED procedure. The two main effects studied were sex and sex steroid status. The relative amounts of mRNA of receptors of growth hormone (GHR), insulin (IR), leptin (LEPR), oestrogen ($ER\alpha$), and of insulin-like growth factor I (IGF-I) were determined in liver and adipose tissue and the relative amounts of mRNA of the androgen receptor (AR) was determined only in adipose tissue. The data on the expression of mRNA of each gene were normalized to each of the control genes; HPRT (liver and adipose) and PRL19 (adipose only). Sex and treatment did not affect the amount of transcripts of the control genes in either liver or adipose tissue. Sex tended to affect the relative amount of $ER\alpha$ in liver ($P=0.0595$) and affected the relative amount of AR in adipose tissue ($P=0.0394$). Hormone treatment affected the relative amount of $ER\alpha$ ($P=0.0392$) and IGF-I ($P=0.0243$) in liver, and in adipose tissue it affected the relative amount of AR ($P=0.0140$). Hepatic expression of $ER\alpha$ mRNA was higher in ewes than in rams, and treated sheep (both sexes) had, or tended to have, a lower expression of $ER\alpha$ and IGF-I. Adipose expression of AR and IGF-I mRNA was higher in treated ewes than all of the other groups. Neither sex nor treatment affected the relative amount of GHR, IR and LEPR transcripts in both tissues, and of $ER\alpha$ transcripts in adipose tissue. Sex steroids seem to regulate transcription of their receptors in liver and adipose tissue, and seem to modulate the somatotrophic axis through regulation of IGF-I transcription.

Key words: Sheep; Endocrinology; Reproduction; Metabolism; $ER\alpha$; AR; GHR; IGF-I; IR; LEPR; Liver; Adipose tissue

9. BIBLIOGRAFÍA

1. ACOSTA, J. 2010. Situación actual y perspectivas del mercado de carne ovina. (en línea). In: Seminario Buenos Tiempos para el Negocio Ovino (2010, Montevideo). Trabajos presentados. Montevideo, SUL. s. p. Consultado 16 ene. 2012. Disponible en http://www.sul.org.uy/Plan_estratégico/ponencias/Jorge_Acosta_INAC.pdf
2. AFOLAYAN, R.A.; FOGARTY, N.M. 2008. Genetic variation of plasma insulin-like growth factor-1 in young crossbred ewes and its relationship with their maintenance feed intake at maturity and production traits. *Journal of Animal Science*. 86: 2068-2075.
3. ANDERSON, L.L.; JEFTINIJA, S.; SCANES, C.G.; STROMER, M.H.; LEE, J.S.; JEFTINIJA, K.; GLAVASKI-JOKSIMOVIC, A. 2005. Physiology of ghrelin and related peptides. *Domestic Animal Endocrinology*. 29: 111-144
4. ASTESSIANO, A.L.; BIANCHI, E. 2004. Leptina, rol en la sub-nutrición energética de las madres gestantes y sus consecuencias en los corderos machos. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 73 p.
5. _____. 2010. Perfiles metabólicos, endócrinos y de expresión génica hepática asociados a cambios en el balance energético de vacas de carne primíparas en condiciones de pastoreo. Tesis Magister en Ciencias Agrarias. Opción Ciencias Animales. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 109 p.
6. BARASH, I.A.; CHEUNG, C.C.; WEIGLE, D.S.; REN, H.; KABITING, E.B.; KUIJPER, J.L.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. 1996. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*. 137: 3144-3147.

7. BARB, C.R. 1999. The brain-pituitary-adipose axis; role of leptin in modulating neuroendocrine function. *Journal of Animal Science*. 77: 1249-1257.
8. BAUMAN, D. E. 2000. Regulation of nutrient partitioning during lactation: homeostasis and homeorhesis revisited. *In: International Symposium on Ruminant Physiology (9th, 2000, France). Proceedings*. New York, CABI. pp. 311-318.
9. BJÖRNTORP, P. 1997. Hormonal control of regional fat distribution. *Human Reproduction*. 12 (1): 21-25.
10. BLACHE, D.; CHAGAS, L.M.; MARTIN, G.B. 2007. Nutritional inputs into the reproductive neuroendocrine control system – a multidimensional perspective. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*. 64: 123-139.
11. BLOCK, S.S.; RHOADS, R.P.; BAUMAN, D.E.; EHRDARDT, R.A.; MCGUIRE, R.A.; CROOKER, B.A.; GRINARI, J. M.; MACKLE, T.R.; WEBER, W.J.; VAN AMBURGH, M.E.; BOISCLAIR, Y.R. 2003. Demonstration of a role for insulin in the regulation of leptin in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 86 (11): 3508-3515.
12. BONDY, C.A.; ZHOU, J. 2005. Growth hormone, insulin-like growth factors and the female reproductive system. *In: Varela-Nieto, I.; Chowen J.A. eds. The growth hormone/insulin-like growth factor axis during development*. s.l., Springer Science/Business Media. pp. 91-115.
13. BOISCLAIR, Y.R.; WESOLOWSKI, S.R.; KIM, J.W.; EHRHARDT, R.A. 2006. Roles of growth hormone and leptin in the periparturient dairy cow. *In: Sejersen, K.; Hvelplund, T.; Nielsen, M.O. eds. Ruminant physiology; digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress*. s.l., Wageningen Academic Publishers. pp. 327-346.
14. BRAMELD, J.M.; ATKINSON, J.L.; SAUNDERS, J.C.; PELL, J.M.; BUTTERY, P.J.; GILMOUR, R.S. 1996. Effects of growth hormone

administration and dietary protein intake on insulin-like growth factor I and growth hormone receptor mRNA expression in porcine liver, skeletal muscle, and adipose tissue. *Journal of Animal Science*. 74 (8): 1832-1841

15. BRANN, D.W.; DE SEVILLA, L.; ZAMORANO, P.L.; MALESH, V.B. 1999. Regulation of leptin gene expression and secretion by steroid hormones. *Steroids*. 64 (9): 659-663.
16. BREIER, B.H. 1999. Regulation of protein and energy metabolism by the somatotrophic axis. *Domestic Animal Endocrinology*. 17: 209 –218.
17. BRUNING, J.C.; GAUTAM, D.; BURKS, D.J.; GILLETTE, J.; SCHUBERT, M.; ORBAN, P.C.; KLEIN, R.; KRONE, W.; MULLER-WIELAND, D.; KAHN, R. 2000. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*. 289: 2122-2125.
18. BUNTER, K.L.; HERMESCH, S.; LUXFORD, B.G.; GRASER, H.U.; CRUMP, R.E. 2005. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) measured in juvenile pigs is genetically correlated with economically important performance traits. *Animal Production Science*. 45 (7-8): 783-792.
19. BUTLER, W. R.; EVERETT, R. W.; COPPOK, C. E. 1981. The relationships between energy balance, milk production and ovulation in postpartum Holstein cow. *Journal of Animal Science*. 53: 742-748.
20. _____.; SMITH, R. D. 1989. Interrelationships between energy balance on postpartum reproductive function in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 72:767.
21. BUTLER, S.T.; MARR, A.L.; PELTON, S.H.; RADCLIFF, R.P.; LUCY, M.C.; BUTLER, W.R. 2003. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle; effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *Journal of Endocrinology*. 176 (2): 205-217.

22. CARBONE, A.; DE LARROBLA, A. 2005. Modulación de la secreción de cortisol por los esteroides sexuales en ovinos. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 77 p.
23. CHEDRESE, P.J. 2009. Introduction to the molecular organization of the endocrine/reproductive system. In: Chedrese, P.J. ed. Reproductive endocrinology; a molecular approach. New York, Springer Science/Business Media. pp. 3-11.
24. CHILLIARD, Y.; BOCQUIER, F.; DOREAU, M. 1998. Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reproductive Nutrition Development*. 38: 131-152.
25. _____.; BONNET, M.; DELAVAUD, C.; FAULCONNIER, Y.; LEROUX, C.; DIJANE, J.; BOCQUIER, F. 2001. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domestic Animal Endocrinology*. 21: 271-295.
26. COHICK, W.S. 1998. Role of the insuline-like growth factors and their binding proteins in lactation. *Journal of Dairy Science*. 81 (6): 1769-1777.
27. CRABB, D.W.; ROEPKE, J. 1987. Loss of growth hormone-dependent characteristics of rat hepatocytes in culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 23 (4): 303-307.
28. DAVIS, M. E.; BISHOP, M.D.; PARK, N.H.; SIMMEN, R.C. 1995. Divergent selection for blood serum insulin-like growth factor I concentration in beef cattle: I. Nongenetic effects. *Journal of Animal Science*. 73 (7): 1927–1932.
29. DELLA TORRE, S.; RANDO, G.; MEDA, C.; STELL, A.; CHAMBON, P.; KRUST, A.; IBARRA, C.; MAGNI, P.; CIANA, P.; MAGGI, A. 2011. Amino acid-dependent activation of liver estrogen receptor alpha integrates metabolic and reproductive functions via IGF-1. *Cell Metabolism*. 13: 205-214.

30. DICKSON, R.B.; EISENFELD, A.J. 1979. Estrogen receptor in liver of male and female rats: endocrine regulation and molecular properties. *Biology of Reproduction*. 21: 1105-1114.
31. DISKIN, M.G.; STAGG, K.; MACKEY, D. R.; ROCHE, J. F.; SREENAN, J. M. 1999. Nutrition and estrous and ovarian cycles in cattle. (en línea). Galway, Ireland, s.e. Consultado 7 dic. 2010. Disponible en <http://www.teagasc.ie/research/reports/beef/4009/eopr-4009.pdf>.
32. EDENS, A.; TALAMANTES, F. 1998. Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. *Endocrine Reviews*. 19 (5): 559-582.
33. EISENFELD, A.J.; RAYMOND, F.A. 1987. Estrogen receptors and androgen receptors in the mammalian liver. *Journal of Steroid Biochemistry*. 27 (4-6): 1109-1118.
34. ERIKSON, H.A. 1982. Different regulation of the concentration of estrogen receptors in the rat liver and uterus following ovariectomy. *Febbs Letters*. 149 (1): 91-95.
35. ETHERTON, T. D.; BAUMAN, D.E. 1998. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiological Reviews*. 78 (3): 745–761.
36. FERNANDEZ ABELLA, D. 1993. Principios de fisiología reproductiva ovina. Montevideo, Hemisferio Sur. 247 p.
37. FRAYN, K.N. 2010. Metabolic regulation; a human perspective. 3rd. ed. Oxford, Wiley-Blackwell. 370 p.
38. GALVIS, R.D.; CORREA, H.J. 2002. Interacciones entre el metabolismo y la reproducción en la vaca lechera; es la actividad glucogénica el eslabón perdido? *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 15 (1): 36-50.
39. GARCÍA SACRISTÁN, A.; CASTEJÓN MONTIJANO, F.; DE LA CRUZ PALOMINO, L.F.; GONZÁLEZ GALLEGU, J.; MURILLO LÓPEZ DE

- SILANES, M.D.; SALIDO RIZ, G. 1995. Fisiología veterinaria. Madrid, Edigrafos. 1073 p.
40. GELMAN, E.P. 2002. Molecular biology of the androgen receptor. *Journal of Clinical Oncology*. 20 (13): 3001-3015.
41. GESTIDO, V. 2007. Parámetros productivos y metabólicos en el pre y postparto de vacas primíparas Hereford pastoreando campo natural. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 136 p.
42. GIOVAMBATTISTA, A.; CASTROGIOVAMI, D.; SPINEDI, E. 2008. Efecto de esteroides sexuales sobre la función endocrina adipocitaria e insulinosensibilidad periférica. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*. 44 (4): 149-161.
43. GONZÁLEZ, C.; ALONSO, A.; GRUESO, N.A.; DÍAZ, F.; ESTEBAN, M.M.; FERNÁNDEZ, S.; PATTERSON, A.M. 2001. Effect of treatment with different doses of 17- β -estradiol on insulin receptor substrate-1. *Journal of the Pancreas*. 2 (4): 140-149.
44. GRIFFITH, M.K.; WILLIAMS, G.L. 1996. Roles of maternal vision and olfaction in suckling-mediated inhibition of luteinizing hormone secretion, expression of maternal selectivity, and lactational performance of beef cows. *Biology of Reproduction*. 54: 761-768.
45. HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7th. ed. México, D.F., McGraw-Hill Interamericana. pp. 1-71.
46. HAMANN, A.; MATTHAEI, S. 1996. Regulation of energy balance by leptin. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. 104: 293-300.
47. HAYNES, W. G.; MORGAN, D.A.; WAISH, S.A.; SILVITZ, W. L.; MARK, A.L. 1998. Cardiovascular consequences of obesity; role of leptine. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 25(1): 65-69.
48. HEINE, P.A.; TAYLOR, J.A.; IWAMOTO, G.A.; LUBAHN, D.B.; COOKE, P.S. 2000. Increased adipose tissue in male and female estrogen

receptor-a knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 97(23):12729-34.

49. HENRY, B.A.; GODING, J.W.; ALEXANDER, W.S.; TILBROOK, A.J.; CANNY, B.K.; DUNSHEA, F.; RAO, A.; MANSELL, A.; CLARKE, I.J. 1999. Central administration of leptin to ovariectomized ewes inhibits food intake without affecting the secretion of hormones from the pituitary gland; evidence for dissociation of effects on appetite and neuroendocrine function. *Endocrinology*. 140 (3): 1175-1182.
50. HESS, B. W.; LAKE, S. L.; SCHOLLJEGERDES, E. J.; WESTON, T. R.; NAYIGIHUGU, V.; MOLLE, J. D. C.; MOSS, G. E. 2005. Nutritional controls of beef cow reproduction. *Journal of Animal Science*. 83: E90-E106.
51. HYATT, M.A.; GOPALAKRISHNAN, G.S.; BISPHAM, J.; GENTILI, S.; McMILLEN, I.C.; RHIND, S.M.; RAE, M.T.; KYLE, C.E.; BROOKS, A.N.; JONES, C.; BUDGE, H.; WALKER, D.; STEPHENSON, T.; SYMONDS, M.E. 2007. Maternal nutrient restriction in early pregnancy programs hepatic mRNA expression of growth-related genes and liver size in adult male sheep. *Journal of Endocrinology*. 192 (1): 87-97.
52. JOHNSON, B.J.; WHITE, M.E.; HATHAWAY, M.R.; CHRISTIANS, C.J.; DAYTON, W.R. 1998. Effect of a combined trenbolone acetate and estradiol implant on steady-state IGF-I mRNA concentrations in the liver of wethers and the longissimus muscle of steers. *Journal of Animal Science*. 76: 491-497.
53. KADOKAWA, H.; MARTIN, G.B. 2006. The influence of nutrition on the reproductive performance of ewes. *Journal of Reproduction and Development*. 52 (1): 161-168.
54. KERR, D. E.; LAARVELD, B.; FEHR, M.I.; MANNS, J.G. 1991. Profiles of serum IGF-I concentrations in calves from birth to eighteen months of age and in cows throughout the lactation cycle. *Canadian Journal of Animal Science*. 71: 695–705.

55. KOBAYASHI, Y.; BOYD, C.K.; BRACKEN, C.J.; LAMBERSON, W.R.; KEISLER, D.H.; LUCY, M.C. 1999. Reduced growth hormone receptor (GHR) Messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle is caused by a specific down-regulation of GHR 1A that is associated with decreased insulin-like growth factor I. *Endocrinology*. 140 (9): 3947-3954
56. LE ROITH, D.; BONDY, C.; YAKAR, S., LIU, J.L.; BUTLER, A. 2001. The somatomedin hypothesis; 2001. *Endocrine Reviews*. 22 (1): 53-74.
57. LIEFERS, S.C.; TE PAS, M.F.W.; VEERKAMP, R.F.; VAN DER LENDE, T. 2002. Association between leptin polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. *Journal of Dairy Science*. 85: 1633-8.
58. LUCY, M.C.; BOYD, C.K.; KOENIGSFELD, A.T.; OKAMURA, C.S. 1998. Expression of somatotropin receptor Messenger ribonucleic acid in bovine tissues. *Journal of Dairy Science*. 81 (7): 1889-1895.
59. _____. 2000. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *Journal of Dairy Science*. 83 (7): 1635–1647.
60. _____. 2003. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction Supplement*. 61: 415-427.
61. _____. 2008. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs; implications for post-partum nutrition and reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*. 43 (2): 31-39.
62. MCDONALD, L.E.; PINEDA, M.H. 1991. *Endocrinología veterinaria y reproducción*. 4^a. ed. México, D.F., McGraw-Hill Interamericana. 551 p.
63. MCGUIRE, M.A.; BAUMAN, D.E.; DWYER, D.A.; COHICK, W.S. 1995. Nutritional modulation of the somatotropin/insulin-like growth factor

- system; response to feed deprivation in lactating cows. *The Journal of Nutrition*. 125: 493-502.
64. MAYES, J.S.; WATSON, G.H. 2004. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obesity Reviews*. 5: 197-216.
65. MAYO, K.E. 2005. Receptors; molecular mediators of hormone action. In: Melmed, S.; Conn, P.M. eds. *Endocrinology; basic and clinical principles*. New Jersey, Humana Press. pp. 9-33.
66. MEIKLE, A.; SAHLIN, L.; FERRARIS, A.; MASIRONI, B.; BLANC, J.E.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; RODRIGUEZ-PIÑÓN, M.; KINDAHL, H.; FORSBERG, M. 2001. Endometrial mRNA expression of oestrogen receptor, progesterone receptor and insulin-like growth factor-I (IGF-I) throughout the bovine oestrous cycle. *Animal Reproduction Science*. 68: 45-46.
67. _____.; TASENDE, C.; SOSA, C.; GARÓFALO, E.G. 2004. The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. *Reproduction, Fertility and Development*. 16: 385-395.
68. MEINHARDT, U.J.; HO, K.K.Y. 2006. Modulation of growth hormone action by sex steroids. *Clinical Endocrinology*. 65: 413-422.
69. MERCER, J. G.; HOGGARD, N.; WILLIAMS, L.M.; LAWRENCE, C.B.; HANNAH, L.T.; TRAYHURN, P. 1996. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Letters*. 387 (2-3): 113-116.
70. MONGET, P.; MARTIN, G.B. 1997. Involvement of insulin-like growth factors in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals. *Human Reproduction*. 1: 33-52.
71. MORRISON, C.D.; DANIEL J.A.; HOLMBERG, B.J.; DJIANE, J.; RAVEN N.; GERTLER, A.; KEISLER, D.H. 2001. Central infusion of leptin into well-fed and undernourished ewe lambs; effects on feed intake and

serum concentrations of growth hormone and luteinizing hormone. *Journal of Endocrinology*. 168 (2):317–324.

72. MULLER, E.E. 1987. Neural control of somatotrophic function. (en línea). *Physiological Review*. 67: 962-1053. Consultado 20 oct. 2012. Disponible en <http://www.deepdyve.com/lp/the-american-physiological-society/neural-control-of-somatotropic-function-mfdXCzqzi6>
73. PÉREZ ROMERO, A. 1997. Regulación del eje somatotropo a largo plazo. Tesis doctoral. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. pp. 3-42.
74. QUINTANS, G.; BANCHERO, G.; CARRIQUIRY, M.; LÓPEZ-MAZZ, C.; BALDI, F. 2010. Effect of body condition and suckling restriction with and without presence of the calf on cow and calf performance. *Journal of Animal Science*. 50: 931–938.
75. RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. 1998. Fisiología animal. Mecanismos y adaptaciones. 4^a. ed. Madrid, Mc Graw Hill. pp. 329 – 375.
76. REAL ACADEMIA ESPAÑOLA. 2001. Diccionario de la lengua española. (en línea). Madrid, Espasa Libros. Consultado mar. 2011. Disponible en <http://rae.es/rae.html>
77. ROCHE, J.F.; CROWE, M.A.; BOLAND, M.P. 1992. Postpartum anoestrus in dairy and beef cows. *Animal Reproduction Science*. 28: 371-378.
78. ROY, A.K.; MILIN, B.S.; MCMINN, D.M. 1974. Androgen receptor in rat liver: Hormonal and developmental regulation of the cytoplasmic receptor and its correlation with the androgen-dependent synthesis of α 2u-globulin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 354 (2): 213-232.
79. SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D.K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L.E.; WILTBANK, M.C. 2002. High feed intake increases liver blood flow and

metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 85:2831–2842.

80. SCARAMUZZI, R.J.; CAMPBELL, B.K.; DOWNING, J.A.; KENDALL, N.R.; KHALID, M.; MUÑOZ-GUTIERREZ, M.; SOMCHIT, A. 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reproductive Nutrition Development*. 46: 339–354.
81. SCARSI, A.; ASTESSIANO, A.L.; BANCHERO, G.; C-ARRIQUIRY, M.; QUINTANS, G. 2010. Effect of short-prepartum supplementation on reproductive and productive performance in primiparous beef cows under grazing. *In: Symposium of International Ruminant Reproduction (8th, 2010, Alaska). Proceeding. s.n.t. s.p.*
82. SCHILLO, K.K. 1992. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *Journal of Animal Science*. 70: 1271-1282.
83. SCHWARTZ, M.W.; SEELEY, R.J.; CAMPFIELD, L.A.; BURN, P.; BASKIN, D.G. 1996. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *Journal of Clinical Investigation*. 98 (5):1101-1106.
84. SEMINARIO DE ACTUALIZACIÓN TÉCNICA REPRODUCCIÓN OVINA (2005, Treinta y Tres, Tacuarembó). 2005. Recientes avances realizados por el INIA. Montevideo, Uruguay, INIA. pp. i-ii.
85. SENGER, P.L. 2005. Pathways to pregnancy and parturition. 2nd. ed. Washington, Current Conceptions. 381 p.
86. SONG, C.S.; RAO, T.R.; DEMYAN, W.F.; MANCINI, M.A.; CHATTERJEE, B.; ROY, A.K. 1991. Androgen receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) in the rat liver: changes in mRNA levels during maturation, aging, and calorie restriction. *Endocrinology*. 128 (1): 349-356.

87. SOSA, C.; ABECIA, J.A.; CARRIQUIRY, M.; FORCADA, F.; MARTIN, G.B.; PALACÍN, I.; MEIKLE, A. 2008. Early pregnancy alters the metabolic responses to restricted nutrition in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*. 36 (1): 13-23.
88. SPICER, L.J.; ALPIZAR, E.; ECHTERNKAMP, S.E. 1993. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production in vitro. *Journal of Animal Science*. 71: 1232–1241.
89. _____.; STEWART, R.E. 1996. Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors. *Biology of Reproduction*. 54: 255–263.
90. SUTHERLAND, E.W.; RALL, T.W. 1960. The relation of adenosine-3';5'-phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones. *Pharmacological Reviews*. 12: 265-299.
91. TARTAGLIA, L.A.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEROS, R.; RICHARDS, G.J.; CAMFIELD, L.A.; CLARK, F.T.; DEEDS, J.; MURI, C.; SANKER, S.; MORIARTY, A.; MOORE, K.J.; SMUTKO, J.S.; MAYS, G.G.; WOOLF, E.A.; MONORE, C.A.; TEPPER, R.I. 1995. Identification and expression cloning of leptin receptor, OB-R. *Cell*. 83 (7): 1263-1271.
92. THORN, S.R.; MEYER, M.J.; VAN AMBURGH, M.E.; BOISCLAIR, Y.R. 2007. Effect of estrogen on leptin and expression of leptin receptor transcripts in prepuberal dairy heifers. *Journal of Dairy Science*. 90 (8): 3742-3750.
93. TSAI, J.M.; O'MALLEY, B.W. 1994. Molecular mechanisms of actions of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual Review of Biochemistry and Molecular Biology*. 84: 279-289.

94. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCIÓN DE ESTADÍSTICAS AGROPECUARIAS. 2011. Anuario estadístico agropecuario 2011. (en línea). Montevideo. pp. 55-66. Consultado 16 ene. 2012. Disponible en www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,7,594,O,S,0,MNU;E;66;8;MNU
95. VAN LIER, E.; MEIKLE, A.; ERIKSSON, H.; SAHLIN, L. 2006. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and thioredoxin are differentially expressed along the reproductive tract of the ewe during the oestrous cycle and after ovariectomy. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1 (5): 1-8.
96. VIÑOLES, C. 2003. Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. Tesis PhD. Veterinary Medicine. Uppsala, Sweeden. Swedish University of Agricultural Sciences. 56 p.
97. WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. 2004. Control of follicular growth; local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*. 82: E63-74.
98. WETTERMANN, R.P.; LENTS, C.A.; CICCIOLO, N.H.; WHITE, F.J.; RUBIO, I. 2003. Nutritional and suckling mediated anovulation in beef cows. *Journal of Animal Science*. 81: 5-48.
99. ZIEBA, D.A.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G.L. 2005. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism; a comparative review. *Domestic Animal Endocrinology*. 29: 166–185.
100. ZOU, K.; ING, N.H. 1998. Oestradiol up-regulates oestrogen receptor, cyclophilin, and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase mRNA concentrations in endometrium, but down-regulates them in liver. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 64 (5-6): 231-237.