

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**EFFECTO DE LA SUBNUTRICIÓN SOBRE EL AMBIENTE UTERINO
DURANTE EL RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA GESTACIÓN EN
OVEJAS**

POR

Marilina TALMÓN ROBAINA.

**TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria**

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2020**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa: _____

Segundo miembro (Tutor): _____
Dra. Ana Meikle

Tercer miembro: _____

Cuarto miembro (co-Tutor): _____
Dra. Andrea Fernández Foren

Fecha:

Autora: _____
Marilina Talmón Robaina

AGRADECIMIENTOS

Llegando al final de esta etapa larga pero hermosa, hay muchas personas a las que agradecer, sobre todo por estar siempre.

A **Mamá** y **Papá** por siempre confiar en que podría y dar todo de su parte para que se cumpliera este gran sueño, me enseñaron a no aflojar nunca. Si hay alguien que hizo un gran esfuerzo para que esto hoy se haga realidad fueron ustedes. Gracias infinitas, éste trabajo es por y para ustedes.

A mi Hermana **Marina** y a **Rodrigo** por estar. Sin su apoyo el camino hubiese sido mucho mas largo y complicado.

A **Maxi** por ser mi compañero incondicional, por el apoyo y siempre darme para adelante. Gracias por tu paciencia.

A los tres soles que iluminan mi vida por darme parte de su tiempo para poder terminar con ésta etapa. **Emi, Joaco, Cata.**

A las amigas, de "toda la vida", desde los primeros días de facultad, gracias por las experiencias inolvidables, el apoyo incondicional, y sobre todo por la gran paciencia. De apoco estamos llegando a terminar con el objetivo que nos propusimos, codo a codo. **Marisa, Analía, Ana Claudia, Manuela, Natalia y Andrea.**

A las grandes compañeras con las que trabajé en el Laboratorio; persona que fui conociendo desde los comienzos de éste trabajo y con las que compartimos muchas experiencias. Siempre dispuestas para ayudar en todo. **Gretel, Pula P, Mariana, Isabel, Paula N, Marlene.**

A los amigos que con el correr de los años en facultad conocí y que hoy son muy especiales, y de una manera u otra me fueron dando el aliento para terminar. **Andrea, Emiliano, Ximena, Fernando, Gustavo, Karla, Javier.**

A mi co-tutora **Andrea Fernandez Foren** por todo el esfuerzo realizado para terminar con éste trabajo que nos permitió desde su comienzo compartir muchas horas juntas.

A **Cecilia Sosa**, muchas gracias por permitirme ser parte de su trabajo, por la confianza y la generosidad.

A mi tutora **Ana Meikle**, muy presente siempre, que no solo me enseñó los caminos de la investigación, sino que me dio las pautas para trabajar en equipo con responsabilidad en todos los ámbitos de la vida, reforzando la enseñanza de mis padres. Gracias por las oportunidades y la confianza.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	5
RESUMEN.....	6
SUMMERY.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
Ciclo estral ovino.....	9
Hormonas: mecanismo de acción.....	9
Gestación temprana.....	11
Oviducto y útero.....	11
Luteólisis vs. reconocimiento materno de la gestación.....	13
Subnutrición y reproducción.....	15
HIPOTESIS.....	16
OBJETIVOS.....	16
Objetivos generales.....	16
Objetivos específicos.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Diseño experimental.....	17
Localización y abundancia tisular de proteínas.....	18
Aislamiento y transcripción reversa de ARN.....	20
PCR en tiempo real cuantitativo.....	20
Análisis estadístico.....	21
RESULTADOS.....	22
Localización y abundancia tisular de proteínas.....	22
Expresión endometrial de transcritos.....	25
DISCUSIÓN.....	28
Efecto de estado reproductivo (cíclicas vs. preñadas).....	28
Efecto del tratamiento nutricional (control vs. subnutridas).....	30
CONCLUSION	32
BIBLIOGRAFÍA.....	33

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Páginas.

Figura 1. Inmunomarcado endometrial de (A) receptor de progesterona (PR), (B) receptor de estrógenos α (RE α), (C) receptor de oxitocina (OXTR), (D) receptor de interferón tipo1 subunidad 2 (IFNAR2) y (E) ciclooxigenasa 2 (COX-2) (Aumento:100X) al día 14 (día 0=estro) en ovejas alimentadas con una dieta 0.5 (Subnutridas) o 1 (Control) veces los requerimientos de mantenimiento. LE= epitelio luminal, SGE= epitelio glandular superficial, DGE= epitelio glandular profundo, S= estroma, M= miometrio. Cuando se sustituyeron los anticuerpos específicos, la ausencia de inmunomarcado confirmó la especificidad de la tinción (F, 400X)..... **19**

Figura 2. Intensidad de tinción endometrial del receptor de progesterona (RP), receptor de estrógeno α (RE α) y receptor de oxitocina (OXTR) al día 14 (día 0=estro) en ovejas cíclicas (barras negras) o preñadas (barras grises) alimentadas con una dieta de 0.5 (Subnutrida) y 1 (Control) veces los requerimiento de mantenimiento. EL=epitelio luminal, EGS=epitelio glandular superficial, EGP=epitelio glandular profundo, ES=estroma superficial, EP=estroma profundo. Los datos se presentan como la media de mínimos cuadrados \pm error estandar. $aP < 0.05$; $xP < 0.1$ **23**

Figura 3. Intensidad de tinción endometrial para IFNAR2 y PCNA al día 14 (día 0=estro) en ovejas cíclicas (barras negras) o preñadas (barras grises) alimentadas con una dieta de 0.5 (Subnutrida) y 1 (Control) veces los requerimiento de mantenimiento. EL=epitelio luminal, EGS=epitelio glandular superficial, EGP=epitelio glandular profundo, ES=estroma superficial, EP=estroma profundo. Los datos se presentan como la media de mínimos cuadrados \pm error estandar. $aP < 0.05$ **24**

Figura 4. Niveles de expresión (normalizados por RPL19) de los transcritos de RP, RE α , OTRX, COX-2, IFNAR2, IGF-I, IGF-II e IGF-1R, al día 14 (día 0=estro) en el útero de ovejas cíclicas (barras negras) o preñadas (barras grises) alimentadas con una dieta de 0.5 (Subnutrida) y 1 (Control) veces los requerimientos de mantenimiento. Diferentes letras indican diferencias dentro del mismo gráfico, $a,b:P < 0,05$; $a,x: P \leq 0,1$ **26**

Tabla 1. Secuencia de primers y tamaño esperado del producto utilizados para el ensayo de RT-PCR en tiempo real. **21**

Tabla 2. Efectos del tratamiento nutricional (0,5X y 1X de los requerimientos de mantenimiento), el estado reproductivo (preñada y cíclica) y su interacción sobre la abundancia de proteínas endometriales (intensidad de tinción) y la expresión del ARNm de las variables estudiadas en el útero ovino el día 14 (día 0=estro)..... **27**

RESUMEN

Para que la gestación se establezca y progrese, es imprescindible que el embrión “informe” a la madre de su presencia y evite la destrucción del cuerpo lúteo (CL). Cualquier acontecimiento (como la nutrición) que interfiera con el proceso de reconocimiento materno de la gestación y el mantenimiento del CL, podría resultar en la muerte embrionaria. En esta tesis investigamos el efecto de la preñez y de la subnutrición sobre la expresión de proteínas endometriales y la expresión génica uterina en ovejas cíclicas y preñadas, alimentadas con una dieta que cubría la mitad (0.5X) o el total (1X) de sus requerimientos de mantenimiento al día 14 de preñez o del ciclo estral. La expresión endometrial de los receptores de progesterona, estrógenos, oxitocina e interferón (RP, RE α , OXTR e IFNAR, respectivamente), la ciclooxigenasa 2 (COX)-2, el marcador de proliferación celular (PCNA), los factores de crecimiento insulino-dependientes (IGF-I y II), y el receptor de IGF-I (IGF-1R) fueron estudiados mediante inmunohistoquímica o PCR en tiempo real. El epitelio luminal de las ovejas cíclicas controles no presentó tinción para RP y se observó abundancia de tinción para RE α , OXTR, COX-2 e IFNAR2. La presencia del embrión disminuyó la expresión de IFNAR2 en la mayoría de los tipos celulares, y aumentó la expresión génica de IGF-I e IGF-II. La subnutrición tendió a aumentar tanto la proteína como la expresión génica de RE α , pero disminuyó la expresión génica de IFNAR2 en ovejas cíclicas. Además, la subnutrición no tuvo ningún efecto sobre la expresión génica uterina en ovejas preñadas. Es más, cuando se observaron efectos del tratamiento en las ovejas cíclicas, estos efectos no se observaron cuando el embrión estaba presente. En esta tesis no se observó un efecto significativo del tratamiento nutricional sobre la expresión de factores vinculados al reconocimiento materno de la gestación al día 14 de la preñez, pero sí de la presencia del embrión.

SUMMARY

It is essential that the embryo signals the mother of its presence in order to establish and develop gestation, and that it avoids the destruction of the corpus luteum (CL). Any event (such as nutrition) that interferes with the process of maternal recognition of pregnancy and the maintenance of CL could result in embryonic death. In this thesis, we investigated the effects of pregnancy and undernutrition on endometrial protein and gene expression in ewes fed with all (1X) or half (0.5X) of their maintenance requirements on Day 14 of pregnancy or of the estrous cycle. The endometrial expression of progesterone, estrogens, oxytocin and interferon receptors (RP, RE α , OXTR and IFNAR, respectively), cyclo-oxygenase (COX)-2, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), insulin-like growth factors (IGF)-I and -II, and IGF-1 receptor (IGF-1R) was studied by immunohistochemistry or real-time PCR. The luminal epithelium of cyclic control ewes was devoid of RP staining and had relatively high levels of RE α , OXTR, COX-2 and IFNAR2. The presence of a conceptus decreased the expression of IFNAR2 in most cell types, and increased the gene expression of IGF-I and IGF-II. Undernutrition tended to increase RE α protein and gene expression, but decreased the gene expression of IFNAR2 in cyclic ewes. Undernutrition of pregnant ewes did not affect the expression of any gene in the uterus. Moreover, in cases where changes due to treatment were observed in cyclic ewes, these changes were negated when a conceptus was present. In this thesis, a significant effect of nutritional treatment was not observed on factors involved in the maternal recognition of pregnancy on day 14, but endometrial changes were observed due to the presence of the embryo.

INTRODUCCIÓN

El estado metabólico puede definirse como la cantidad de nutrientes y energía que están disponibles para el animal en un determinado momento, y depende de la cantidad de alimento consumido, de la cantidad de reservas corporales y del ritmo de utilización de la energía (Blache y col., 2006). Los cambios en el estado metabólico son un regulador importante de la actividad reproductiva, pudiendo actuar a diferentes niveles en el eje reproductivo. Aunque se sabe que la nutrición tiene influencia sobre la función reproductiva en los rumiantes, esta relación es compleja, y ha sido ampliamente revisada (Rhind, 1992; Chilliard y col., 1998; O'Callaghan y Boland, 1999; Abecia y col., 2006).

En ovinos, uno de los aspectos más estudiados es el efecto de la sobrealimentación o suplementación (flushing), como herramienta para incrementar la tasa de ovulación. Sin embargo, es la subnutrición (la alimentación por debajo de los requerimientos para el mantenimiento del peso vivo) la que se presenta como problema en los rebaños comerciales, principalmente en lugares donde la alimentación está basada en el pastoreo. En los sistemas extensivos, el esquema nutricional al que están sometidos los animales presenta grandes fluctuaciones a lo largo del año (Lindsay y col., 1993). A pesar de que los requerimientos energéticos para el crecimiento folicular, la ovulación y la gestación temprana son muy bajos comparados con los requerimientos para el mantenimiento, una nutrición inadecuada puede tener efectos deletéreos importantes en la reproducción (O'Callaghan y Boland, 1999).

Comparado con la cantidad de estudios que investigan los efectos de la subnutrición sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, los estudios que investigan sus efectos sobre el desarrollo embrionario y el ambiente uterino son escasos. En ovinos se ha demostrado que la subnutrición aumenta la mortalidad de los embriones el día 11 de la gestación tras 25 días de subnutrición (Rhind y col., 1989c). En otros trabajos con tratamientos nutricionales comparables, se ha recuperado un porcentaje similar de embriones en ovejas subnutridas y controles los días 4, 8 y 9, aunque los de ovejas subnutridas presentaban un retraso en su desarrollo (Abecia y col., 1997; 1999a; Lozano y col., 2003). A su vez, se ha reportado que las tasas de gestación no fueron afectadas por la subnutrición en los días 8 y 9, pero si en los días 14 y 15 de gestación (Abecia y col., 1995; 1997; 1999b).

El proceso fisiológico por el cual el embrión señala su presencia al sistema materno y prolonga la vida del cuerpo lúteo (CL), se ha denominado como reconocimiento materno de la gestación (Short, 1969). El día aceptado de reconocimiento materno de la preñez en ovinos es el día 14, momento en que se desencadenaría la luteólisis en animales no preñados. El embrión debe ser capaz de suprimir el mecanismo luteolítico (asegurando de esta manera la viabilidad del cuerpo lúteo y la continuación de la síntesis de progesterona -hormona de la preñez-) para asegurar su supervivencia. Cualquier acontecimiento que interfiera con el proceso de reconocimiento materno de la gestación, podría resultar en la muerte embrionaria. La nutrición es uno de los factores más importantes que afectan la eficiencia en la reproducción, y por lo tanto la eficiencia productiva y económica en los sistemas de explotación ovina (Azzarini, 2002). Es necesario entonces, conocer de qué manera la subnutrición puede afectar la expresión génica y proteica de factores vinculados al reconocimiento materno.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Ciclo estral ovino

Las ovejas se clasifican como poliéstricas estacionales de día corto (Viñoles, 2003). Durante el otoño, se activan desde el punto de vista reproductivo presentando la hembra actividad sexual, momento al cual se le denomina estación reproductiva. Dentro de la estación reproductiva se presenta el ciclo estral, que es el intervalo que se da entre un estro (celo) y el otro; en los ovinos este intervalo es de 17 ± 2 días (Fernandez Abella, 2008a).

Estos ciclos están moderados por una serie de acontecimientos neuro-endócrinos en los cuales participan varios órganos y las hormonas secretadas por ellos: el hipotálamo con la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH); la hipófisis, con la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo-estimulante (FSH); los ovarios, secretando los estrógenos (E) y la inhibina a través de los folículos, y la progesterona (P4) y la oxitocina por el CL; y el útero, liberando prostaglandina (PG) F2 α (Goodman, 1994). El hipotálamo mediante la liberación de GnRH estimula la liberación de LH por la hipófisis, la cual induce el desarrollo del folículo pre-ovulatorio productor de E. Se genera una retroalimentación positiva entre el E y la GnRH, de tal manera que aumenta la frecuencia de pulsos de secreción de GnRH y de LH, hasta llegar al pico preovulatorio de ambas hormonas, desencadenando la ovulación, la cual ocurre al finalizar el celo, formando posteriormente el CL. La producción de P4 por el CL se mantiene elevada por 12 a 14 días determinando la fase luteal del ciclo. El predominio de la P4 hace que al cabo de esa fase se produzca un mecanismo de retroalimentación positivo, donde la oxitocina hipofisiaria y luteal favorecen el aumento de la secreción en forma de pulsos de la PGF2 α endometrial, lo cual desencadena la regresión del CL o luteólisis en los días 14 a 16 del ciclo estral, con la subsiguiente caída de las concentraciones de P4. En este momento comienza nuevamente el predominio estrogénico por 2 a 3 días, determinando la fase folicular del ciclo sexual. Así, la oveja retorna al celo (estro) y completa su ciclo sexual de 17 días (Goodman, 1994).

Hormonas: mecanismo de acción

Las hormonas producidas por los distintos órganos se secretan al torrente sanguíneo llegando a todos los tejidos, pero sólo algunos tienen la capacidad de responder a ellas; éstos se denominan tejidos diana. Lo que hace que exista esta especificidad tisular es la presencia de receptores específicos para las hormonas que se encuentran ubicados en las células de estos tejidos diana. Los receptores son proteínas que se unen a la hormona (ligando) con alta afinidad, y la unión con la hormona provoca una respuesta biológica en los tejidos sensibles.

Receptores de progesterona y estrógenos (RP y RE)

En el ovario, a partir del colesterol, se sintetizan las hormonas esteroideas P4 y E (Niswender y Nett, 1994), que por su naturaleza lipídica entran a las células por difusión uniéndose a receptores específicos localizados en el núcleo. Los receptores de P4 y E (RP y RE, respectivamente) junto con otros receptores de hormonas

esteroideas, son parte de una gran familia de factores de transcripción activados por la unión de estos a las hormonas. Los receptores esteroideos son macromoléculas, proteínas, ubicadas en el núcleo celular, y que presentan sitios o dominios específicos donde se unen las hormonas y dominios de unión al ADN que interactúan con secuencias específicas de éste (elementos de respuesta a esteroides, ERE) (Ortega-Domínguez B y col, 2015). Cuando la hormona esteroidea se une a su receptor suceden cambios de conformación que activan el complejo hormona-receptor (lo cual implica su dimerización), y posibilita la unión a los ERE activando genes y estimulando su transcripción para producir ARN mensajero (ARNm). En el citoplasma, los ARNm son traducidos produciendo proteínas que influyen en la función celular.

Existen dos tipos de receptores de estrógenos (RE) productos de dos genes diferentes; el RE α es el receptor clásico y predominante en el tracto reproductivo (Meikle y col., 2004a), y el RE β también reportado en el endometrio (Hapangama y col., 2015). Ambos receptores presentan una alta homología en sus ERE y en sus sitios de unión al ligando, por lo que se asume que tienen un mismo mecanismo de acción. Por otro lado, al menos dos isoformas del RP han sido descritas en ratas: A y B (Conneely y col., 2001). Los RP-A y RP-B son expresados por diferentes promotores sobre el mismo gen y ambos se unen a la P4 con similar afinidad e interactúan con los mismos ERE.

El 17 β estradiol (E2), estimula la síntesis de su propio receptor y también el de RP, mientras la P4 provoca la regulación a la baja de ambos receptores (Clark y Mani, 1994). De esta manera alrededor del celo, se presentan valores máximos de concentración uterina de RP y RE, como respuesta a la acción estimulante de los E, y durante la fase luteal tardía se presentan los valores mínimos de dichos receptores debido a la acción inhibitoria de la P4 (Miller y col., 1977).

Receptor de oxitocina (OXTR)

La oxitocina, por ser un péptido, es insoluble en la membrana celular lipídica, por lo tanto, los receptores de las hormonas peptídicas se ubican a nivel de la membrana celular. El receptor de oxitocina (OXTR) pertenece a la familia de los receptores unidos a proteínas G (GPCR) clase I, que comparten una estructura característica de siete dominios transmembrana unidos por lazos intra y extra-celulares (Ivell y col., 2001). En esta familia también se encuentran los receptores de GnRH, LH, FSH y PGs entre otros. Estos receptores luego de unirse a la hormona, se unen a la proteína G y desencadenan múltiples y complejas cascadas de segundos mensajeros, dando lugar a una variedad de eventos celulares, como son el aumento de la contracción del músculo liso, el aumento de la síntesis de PGs en el endometrio o la activación de procesos de transcripción génica y síntesis proteica (Gimpl y Fahrenholz, 2001).

De la misma forma que los esteroides, la oxitocina regula a su propio receptor. Sheldrick y Flick-Smith (1993) demostraron que la adición de oxitocina al cultivo de células endometriales ovinas disminuye la capacidad de unión del receptor. Además, los esteroides ováricos ejercen un papel importante en la regulación del OXTR uterino. El E2 produce un aumento de la síntesis de OXTR, y la P4, de forma indirecta mediante la inhibición del RE, produce la disminución de E2 con la

consiguiente disminución de OXTR (Sheldrick y Flick-Smith, 1993; Wathes y Lamming, 1995; McCracken y col., 1999). Por lo tanto, el OXTR también tiene un patrón de expresión cíclico a lo largo del ciclo estral, presentando altos niveles en el celo por el dominio de los E y bajos niveles durante la fase luteal media donde la P4 se encuentra en alta concentración.

Gestación temprana

Luego de producida la fertilización, se producen las primeras divisiones celulares del embrión en el oviducto, alcanzando el útero como mórula al día 4 post-celo. Alrededor del día 6 se forma el blastocisto, el que eclosiona de la zona pelúcida entre los días 8 a 9. Hacia el día 11 empieza a adoptar una forma tubular y se elonga hasta convertirse en un embrión filamentososo entre los días 12 y 16. Esta elongación del blastocito marca el comienzo de la implantación, pero la adhesión firme al endometrio no ocurre hasta el día 16 (Wintenberger-Torres y Flechon, 1974). Desde el comienzo, el embrión se desarrolla libremente en el oviducto y el útero, y es dependiente de sus secreciones hasta el momento que ocurre la implantación (Ashworth, 1995; Fleming y col., 2004; Spencer y col., 2004b).

El desarrollo embrionario previo a la implantación se lo puede dividir en dos fases, temprano y tardío, en función al tiempo en que están alojados en oviducto y útero, respectivamente (Leese, 1995). Toda esta etapa es esencial para la futura implantación y el establecimiento de la gestación (Watson y col., 1999). Además, la alta incidencia de mortalidad embrionaria que ocurre durante la fase embrionaria temprana pone de manifiesto la importancia de esta etapa en la supervivencia embrionaria (Roche y col., 1981; Goff, 2002).

Oviducto y útero

Anatómicamente, el oviducto se diferencia en tres zonas: el infundíbulo que es el extremo anterior u ovárico del oviducto, se encarga de captar el ovocito del ovario para que ocurra su fertilización, la ampolla que es la de mayor longitud y diámetro de todo el oviducto y el istmo el cual es fino y se une a la ampolla. Una vez que se dan las primeras divisiones celulares en el oviducto, el embrión alcanza el útero alrededor del día 4 post-celo, como mórula.

Histológicamente se compone por la mucosa y la *muscularis*. La mucosa está formada por un epitelio compuesto por dos tipos de células principales: las ciliadas y las no ciliadas o secretoras (Fawcett, 1988).

Respecto al útero, en los rumiantes, se caracteriza por presentar un cuerpo pequeño, dos cuernos largos y bien definidos, y un cuello o cérvix. El útero de las ovejas es bipartito, es decir, existe un tabique entre ambos cuernos, pero éstos están unidos caudalmente. Su gruesa pared, llamada *miometrio*, está formada en su mayor parte por músculo liso. La luz uterina se encuentra tapizada por el *endometrio*, mucosa glandular formada por un epitelio cilíndrico simple desde el que se extiende una serie de glándulas tubulares, y por el *estroma* endometrial (Fawcett, 1988; Hafez, 1996). Las glándulas endometriales son estructuras ramificadas y sinuosas que sintetizan y secretan enzimas, factores de crecimiento y hormonas entre otras sustancias. Esta secreción es esencial para la supervivencia y

crecimiento embrionario (Taylor y col., 2000). Una particularidad de los rumiantes es que el endometrio presenta zonas aglandulares de unión a las membranas fetales llamadas carúnculas, que son los sitios de implantación y placentación, ya que junto con los cotiledones fetales forman los placentomas, a través de los cuales ocurre el intercambio de gases y nutrientes para el embrión (Gray y col., 2000).

El tracto reproductivo de los mamíferos sufre cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos durante el ciclo estral. En relación a la regulación de estos cambios, las hormonas esteroides producidas por los ovarios tienen un rol esencial (Geisert y col., 1992; Buhi y col., 1997). Los E son responsables de producir un notable crecimiento uterino, las glándulas crecen, penetran profundamente en el estroma y comienzan a enrollarse, pero su capacidad secretoria plena se da bajo la influencia de la P4 (Niswender y Nett, 1994). Además, dado que la presencia de RE α en las glándulas se ha relacionado con la preparación endometrial para sostener la preñez (Kimmins y MacLaren 2001), es interesante conocer los niveles del antígeno de proliferación celular (PCNA), proteína accesoria de la ADN polimerasa, siendo su expresión correlativa con la proliferación celular (Waseem y Lane 1990). Por su parte, la P4 asegura la quiescencia uterina, estimula y mantiene las funciones secretorias del endometrio necesarias para que el crecimiento temprano del embrión, la implantación, placentación, y un correcto desarrollo feto-placentario sean posibles hasta el término de la gestación (Graham y Clarke, 1997).

El fluido existente en la luz del tracto reproductivo es un medio complejo formado por trasudado de la sangre y por secreción activa de las células epiteliales (Walker y col., 1996). El producto de secreción más abundante en el oviducto es un grupo de glicoproteínas de alto peso molecular, específico del oviducto, aunque también se secretan factores de crecimiento y citoquinas. Las hormonas esteroideas son las encargadas de regular su secreción, siendo los E los que las aumentan y la P4 la que las disminuye (Murray y col., 1995; Buhi, 2002). Además, en el fluido del oviducto, también están presentes factores embriotróficos y mitogénicos, como son los factores de crecimiento (Gandolfi y col., 1989), que regulan la función del oviducto y/o el desarrollo embrionario actuando de forma autócrina o parácrina (Buhi y col., 1997). En relación al útero, también se han descrito numerosos factores importantes para el correcto desarrollo embrionario que el endometrio secreta a su luz. Uno de los principales, es el IGF-I, encargado de promover el desarrollo embrionario, el cual es secretado en forma endocrina por el hígado y parácrina por el útero (Wathes y col., 1998; Watson y col., 1999). También el IGF-II se asocia al desarrollo embrionario en la etapa de pre-implantación y al desarrollo placentario (Wathes y col., 1998). Estos factores de crecimiento podrían estimular el desarrollo embrionario directamente, o indirectamente, estimulando la secreción endometrial.

Luteólisis vs. reconocimiento materno de la gestación

Dada la importancia de la P4 en la fisiología uterina, uno de los principales desafíos que tiene el embrión previo a su implantación es asegurar que la producción de P4 por el CL se mantenga, evitando que se produzca la luteólisis.

Luteólisis

El mecanismo por el cual el CL es destruido ocurre en el epitelio luminal y glándulas superficiales del endometrio a través de la acción de las hormonas P4, E y la oxitocina al unirse a sus respectivos receptores (Spencer y col., 2004 a). Durante la fase folicular, los E estimulan la síntesis de estos receptores y durante la fase luteal la P4 suprime la síntesis de RE y OXTR. Sin embargo, la exposición prolongada durante 8 a 10 días a altos niveles de P4, inhibe la expresión del propio RP, terminando con el bloqueo sobre RE y OXTR, los cuales aumentan rápidamente. La oxitocina induce, entonces, la liberación de pulsos luteolíticos de PGF2 α endometrial en los días 14 a 16 del ciclo estral y el CL regresa (Spencer y col., 2004 a).

Un paso clave para la síntesis de todas las prostaglandinas (PGs) es la necesidad de conversión del ácido araquidónico a PGH2 por la prostaglandina-endoperóxido H sintasa, llamada también ciclooxigenasa (COX). La COX presenta dos isoformas: la COX-1 que se expresa constitutivamente en los tejidos, y la COX-2, que no es constitutiva, sino que puede ser inducida y actúa en distintas condiciones fisiológicas y patológicas de los tejidos animales. Se pueden observar cambios importantes de la COX-2 durante el ciclo sexual y la gestación, sugiriendo que tiene un papel esencial en estos acontecimientos (Charpigny y col., 1997). Las dos isoformas son proteínas integrales de las membranas celulares y del retículo endoplásmico, y la COX-2 se ha localizado también a nivel de la membrana nuclear (Smith y col., 1996; Goff, 2004).

La síntesis de PGF2 α es estimulada por la oxitocina actuando a través del OXTR (McCracken y col., 1999). Se ha demostrado que la oxitocina estimula la síntesis del ARNm de COX-2 en cultivos de células endometriales bovinas, pero no de COX-1, y cuando se adhiere un inhibidor específico de COX-2 al cultivo, disminuye el aumento de PGF2 α inducido por la oxitocina (Asselin y col., 1997a). Sumado a esto, en un experimento en el que se trató a ovejas con oxitocina *in vivo*, se logró estimular la síntesis del ARNm de COX-2, resultando en un aumento de la PGF2 α endometrial (Burns y col., 1997).

Reconocimiento Materno de la gestación

El proceso fisiológico por el cual el embrión señala su presencia al sistema materno y prolonga la vida del CL, se ha denominado reconocimiento materno de la gestación (Short, 1969). En ovinos, este evento se produce alrededor del día 14 de la gestación.

Los primeros trabajos que evidenciaron "la señal" del embrión hacia la madre, fueron los experimentos de Moor y Rowson (1966c; 1966b; 1967; 1969) en los que observaron que cuando a ovejas gestantes se les extraía el embrión antes del día 12 de gestación, el CL sufría regresión; pero si se extraía el día 13 o 14, entonces la

vida del CL se prolongaba. A su vez, cuando se transferían embriones desde el día 5 hasta el día 12, se establecía la gestación, mientras que las transferencias en los días 13 y 14 no eran exitosas y las ovejas retornaban al celo. Estos autores establecieron que el momento crítico para mantener la vida del CL en ovejas estaba entre los días 12 y 13 de la gestación y que existía alguna sustancia que el embrión secretaba y que evitaba la luteólisis. Esta sustancia que el embrión secreta es la proteína trofoblástica ovina (Godkin y col., 1982), encargada del bloqueo del mecanismo luteolítico. Dado que esta proteína presenta actividades compartidas con los interferones (IFN) y que presenta una gran homología con la secuencia del interferón α , fue clasificada dentro de la familia de los interferones tipo I (Imakawa y col., 1987; Roberts, 1989), y se la denominó interferón tau (IFN-T). Se ha demostrado que el IFN-T es sintetizado hasta el día 21, presentando máximas concentraciones el día 14 de la gestación en ovinos (Godkin y col., 1982; Hansen y col., 1988; Spencer y col., 2004a). Además, la mayor producción de IFN-T está asociada a la elongación del embrión, pero el aumento se debe principalmente al aumento de tamaño del trofoblasto más que a un incremento en su síntesis (Goff, 2002). La elongación rápida del trofoblasto es imprescindible para una mayor síntesis de IFN-T, ya que su ARNm sólo se observa en las células trofoblásticas extraembrionarias y es casi inexistente en otras partes del embrión (Farin y col., 1989; Guillomot y col., 1990). Por lo tanto, el tamaño del embrión es importante para evitar la luteólisis; embriones pequeños no producirán suficiente IFN-T.

El mecanismo clásico de acción del IFN-T implica en primer lugar la unión a su receptor de membrana (IFNAR). El IFNAR está compuesto por dos subunidades, IFNAR1 e IFNAR2, ambas necesarias para la unión al ligando y la señalización intracelular (Domanski y Colamonic, 1996). Al unirse el IFN a su receptor, se activan las Janus Kinasas y tirosina Kinasas que fosforilan a los transductores de señal y activadores de transcripción 1, 1A y 2. Las proteínas fosforiladas, se unen a un factor regulador de IFN (IRF) formando un complejo que al llegar al núcleo se une a los elementos de respuesta al IFN en genes sensibles al IFN, modulando su transcripción (Bazer y col., 1997; Demmers y col., 2001). La acción del IFN-T en la célula está modulada por los IRF, de los cuales, los más conocidos son el IRF-1 y el IRF-2. IRF-1 activa la transcripción, mientras que el IRF-2 es su represor antagonista y solo se expresa en las células después que IRF-1 se haya expresado, ya que este lo activa (Harada y col., 1994).

El IFN-T, sintetizado por el trofoblasto (Roberts y col., 1992), actúa en forma paracrina a través de su receptor (IFNAR) sobre el epitelio luminal y glandular del endometrio, evitando la transcripción del gen de OXTR (ya sea directa o indirectamente inhibiendo primero la síntesis de $RE\alpha$), y suprimiendo de esta manera el desarrollo del mecanismo luteolítico en el endometrio (Spencer y Bazer, 1996). El IFN-T es capaz de regular la transcripción del $RE\alpha$ y OXTR, ya que en estos genes existen elementos de respuesta al IFN (Spencer y Bazer, 1996; Bathgate y col., 1998). Al inhibir el aumento de la expresión de OXTR, el embrión evita en última instancia la producción de pulsos luteolíticos de la $PGF2\alpha$, con lo cual mantiene el CL y asegura un ambiente uterino propicio para su desarrollo (Spencer y col., 2004 a).

Subnutrición y reproducción

La subnutrición en ovinos (definida como la alimentación por debajo de los requerimientos para mantener el peso vivo) se presenta como un importante problema en los rebaños comerciales, sobre todo donde la alimentación es a base de pastoreo. En países de clima templado, donde todo el año los animales pastorean pastos naturales, las variaciones estacionales en la cantidad y calidad de los pastos modifican las ganancias de peso a lo largo del año, lo que se asocia a la eficiencia reproductiva global (Viñoles y col., 2009).

Se ha demostrado previamente en ovejas (Abecia y col. 2013) que una dieta que proporciona la mitad de los requerimientos nutricionales diarios de mantenimiento, produce una disminución significativa de la performance reproductiva. Abecia y col., (1995; 1997; 1999) comunicaron que la cantidad de embriones recuperados los días 8 y 9 de gestación era similar en ovejas subnutridas y controles, pero encontraban diferentes tasas de gestación los días 14 y 15. Además, los embriones recuperados de las ovejas subnutridas presentaban retraso en el desarrollo con respecto a los de las ovejas bien alimentadas. Un ambiente materno alterado puede no afectar al embrión inmediatamente, pero sí comprometer su desarrollo en etapas posteriores (Leese, 2005).

Las hormonas esteroideas son esenciales para modular la fisiología del oviducto y del útero, y estimular sus secreciones (Geisert y col. 1992; Buhi y col. 1997). Cualquier cambio en la capacidad de respuesta del útero a las hormonas esteroideas podría resultar en un ambiente uterino alterado o no preparado de manera óptima para sustentar el desarrollo de un posible embrión. En subnutrición, Sosa y col. (2004, 2006, 2008) reportan que las ovejas presentan alteraciones en la expresión génica del tracto reproductivo. Se ha demostrado que las ovejas subnutridas presentan una sensibilidad reducida a los esteroides el día 5 del ciclo sexual: menor contenido endometrial de RP (Sosa y col. 2004) y RE α (Sosa y col. 2006), menor capacidad de unión de RP y RE endometriales (Sosa y col. 2006) y menor expresión en el oviducto ipsilateral al cuerpo lúteo (CL) del ARNm de RP y RE α (Sosa y col. 2008). Este hallazgo de que las ovejas subnutridas tienen una menor sensibilidad a los esteroides ováricos el día 5, podría traducirse en un inadecuado sustento de las necesidades de un embrión en crecimiento y podría explicar el aumento de mortalidad embrionaria asociada a la subnutrición. En estos mismos trabajos, también en animales cíclicos, no se encontraron diferencias en la expresión o inmunotinción de RP y RE los días 10 o 14 del ciclo estral, por lo que los autores sugirieron que una funcionalidad uterina alterada durante la fase luteal temprana (día 5), podría ser la causa del retraso en el desarrollo embrionario y consecuentes pérdidas de preñez durante la gestación temprana.

Además, varias de las hormonas metabólicas que ayudan a mantener la homeostasis del organismo y cuyas concentraciones plasmáticas varían con los cambios en el estado metabólico han sido postuladas como posibles mediadores entre éste, el sistema reproductor y el embrión. Entre los candidatos más probables de mediar entre los cambios nutricionales y el ambiente uterino se encuentran la insulina, los IGF y la leptina (Meikle y col. 2018). De hecho, en rumiantes, el tracto

reproductivo de la hembra y el embrión tienen receptores para estas hormonas (Dupont y col. 2014, Sequeira y col. 2015), y algunas de estas hormonas son producidas por el propio tejido uterino, como IGF-I e IGF-II (Thissen y col. 1994). Se ha reportado que ambos IGFs promueven el desarrollo embrionario (Byrne y col. 2002), y de Brun y col. (2013) reportaron que animales subnutridos presentaron una menor expresión génica de IGF-I en útero e IGF-II en oviducto al día 5 de gestación, lo que podría comprometer la supervivencia embrionaria. Además del hecho que el IGF-I se encuentra implicado en el aumento de secreción de proteínas y nutrientes del endometrio, que ocurre alrededor del estro (Miller y col. 1977).

HIPÓTESIS

La subnutrición afecta la expresión génica y proteica de factores que están en la base del mecanismo luteolítico / reconocimiento materno y este efecto es dependiente de la presencia del embrión.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

Estudiar los efectos de la subnutrición y la presencia del embrión sobre la localización, abundancia y expresión génica uterina de factores involucrados en el reconocimiento materno de la gestación (RP, RE α , OXTR, COX-2, IFNAR2 y PCNA) y en la preparación del ambiente uterino para la gestación (IGF-I, IGF-II e IGF-1R).

Objetivos Específicos

- Determinar la localización y abundancia de los receptores de progesterona (RP), estrógeno (RE α), oxitocina (OXTR) e interferón-tau (IFNAR), de ciclooxigenasa 2 (COX-2), de los factores de crecimiento insulínico tipo I y II (IGF-I e IGF-II) y su receptor (IGF-1R) endometriales.
- Determinar la abundancia del antígeno de proliferación celular (PCNA) en el endometrio.
- Determinar la expresión relativa de ARNm de RP, RE α , OXTR, COX-2, IFNAR2, IGF-I, IGF-II e IGF-1R en útero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Este experimento fue realizado en la estación experimental de la Universidad de Zaragoza (Zaragoza, España, latitud 41°41' N). Se realizó bajo la supervisión del Comité de Ética de la Universidad de Zaragoza y de acuerdo a las exigencias de la Unión Europea para la experimentación animal.

Durante la estación reproductiva (Diciembre-Marzo), se seleccionaron 46 ovejas adultas multíparas Rasa Aragonesa, con un peso vivo (PV) promedio de 61.2 ± 2.2 kg y una condición corporal (CC) de 3.4 ± 0.1 (escala 0–5; Russel y col. 1969). Se alojaron en jaulas individuales y se les ofreció una dieta que cubría los requerimientos de mantenimiento (AFRC 1993) durante 1 mes antes del comienzo de los procedimientos experimentales. La dieta estuvo compuesta por 0.42 kg de pellets y 0.70 kg de paja de cebada por día, proporcionando 7.8 MJ de energía metabolizable por oveja. Los pellets consistían de cebada (85%) y soja (15%). Los animales tenían acceso al agua y al suplemento mineral sin restricción. Tras este período, se realizó la sincronización de celos que consistió en la inserción de esponjas intravaginales conteniendo 40mg de progestágenos (acetato de fluorogestona; Intervet, Salamanca, España) durante 12 días. Al momento de la inserción de las esponjas, las ovejas fueron asignadas a dos grupos de acuerdo al tratamiento nutricional que recibieron: 1) grupo control (1M, n=21) que continuó con la misma dieta y 2) grupo subnutrido (0.5M, n=25) al que se le ofreció la mitad de la dieta control. Estos tratamientos nutricionales se mantuvieron hasta el final del experimento. A la retirada de las esponjas, las ovejas fueron inyectadas con 300 UI, i.v., de gonadotropina coriónica equina (Intervet, Salamanca, España). Trece ovejas del grupo control y 18 ovejas del grupo subnutrido se aparearon con machos enteros para establecer un grupo de ovejas gestantes, mientras que, al resto, solo se les detectó el celo utilizando machos vasectomizados. De esta manera se obtuvieron ovejas cíclicas y preñadas en cada grupo nutricional. Al día 14 del ciclo estral o de la preñez, los animales fueron anestesiados con una inyección de 10 mL de tiopental sódico (20 mg kg⁻¹; Tiobarbital; Braun Medical, Jaen, España) y luego fueron sacrificados con una inyección de 5-10 mL 50kg⁻¹ T-61 (Intervet). Los cuernos uterinos se lavaron con 10 mL de solución salina (0.9% w/v NaCl) y la preñez se determinó mediante la presencia de un embrión aparentemente normal. Aquellos animales que presentaron problemas de salud, que no manifestaron celo, que presentaron fases luteales anormales o que luego del apareamiento no quedaron preñadas fueron excluidos del experimento. Los grupos experimentales finales fueron: grupo control-cíclico (CC, n=5), grupo control-preñado (CP, n=6), grupo subnutrido-cíclico (SC, n=6) y grupo subnutrido-preñado (SP, n=7). Una semana antes de iniciarse las dietas diferenciales, se tomaron muestras de sangre de la vena yugular cada 2 días hasta finalizar el experimento, las cuales se centrifugaron (1000 g, 10min) y el plasma fue almacenado a -20°C hasta su análisis. Además, al momento de la colocación de las esponjas, al retiro de las mismas y al momento del sacrificio de las ovejas, se determinó la CC y el PV (días -13,-1 y 14 respecto al celo; celo = día 0). Se procedió a la disección del tejido uterino (incluido el endometrio y el miometrio) del tercio medio del cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo (CL) de cada oveja. Una sección fue fijada con paraformaldehído al 4% en

solución salina de buffer-fosfato (PBS) y embebida en parafina para realizar inmunohistoquímica y otra sección se congeló con nitrógeno líquido y se conservó a -80°C para su posterior procesamiento.

Localización y abundancia tisular de proteínas

Para localizar y estimar la abundancia de las diferentes proteínas (RP, RE α , OXTR, IFNAR2, COX-2 y PCNA) se realizaron cortes transversales (5 μ m) del cuerno uterino ipsilateral al CL, y se utilizó la técnica de inmunohistoquímica (sistema avidina-biotina-peroxidasa) previamente descrita por Meikle y col., (2000). Se utilizaron anticuerpos primarios monoclonales de ratón anti-RP (Zymed, South San Francisco, CA, USA), anti-RE α , anti-PCNA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) y anti-OXTR (Rohto Pharmaceutical, Osaka, Japón) diluidos 1:100, 1:25, 1:100 y 1:75 en PBS, respectivamente, y anticuerpos policlonales de conejo anti-IFNAR2 (Santa Cruz) y anti-COX-2 (Cayman Chemical) diluidos 1:100 y 1:200 en PBS, respectivamente. Los controles negativos para cada receptor se obtuvieron reemplazando el primer anticuerpo por una IgG homóloga no inmune en equivalente concentración (Santa Cruz). Luego de la unión del primer anticuerpo, los tejidos se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado (horse anti-mouse or goat anti-rabbit IgG; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluido 1:200 en suero normal de caballo o cabra, respectivamente, y luego con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite; Vector). El sitio de unión del complejo enzimático al tejido se visualizó por medio de 3,3'-diaminobenzidina en H₂O₂ (DAB, Vector), un cromógeno que produce un precipitado marrón insoluble cuando se incubaba junto con la enzima. Las secciones de tejido se colorearon con hematoxilina. Para todas las proteínas, las muestras fueron analizadas en el mismo ensayo de inmunohistoquímica.

Análisis de imagen. Para estimar la expresión de las proteínas de interés en el endometrio, se realizó un análisis de imagen subjetivo llevado a cabo por 2 observadores independientes que desconocían la conformación de los grupos (Sosa y col., 2004). Se analizaron 10 campos por cada tipo celular por animal con un aumento de 1000X en todas las ovejas. La intensidad de tinción se clasificó como negativa (-), leve (+), moderada (++) o intensa (+++) y cada categoría se expresó como porcentaje de la cantidad total de células (Thatcher y col., 2003). A partir de esta evaluación se estudiaron dos variables: la proporción de células positivas y la intensidad de tinción. La intensidad de tinción se calculó mediante la siguiente fórmula: $1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3$, donde n es igual a la proporción de células con intensidad leve (1), moderada (2) o intensa (3) (Boos y col., 1996).

Todas las proteínas fueron evaluadas en 5 compartimentos endometriales, a saber, epitelio luminal (EL), epitelio glandular (arbitrariamente divididos en 2 secciones, epitelio glandular superficial (EGS), próximo a la luz uterina, y epitelio glandular profundo (EGP), próximo al miometrio) y estroma (clasificado como superficial (ES) y profundo (EP) usando el mismo criterio que en epitelio glandular). El RP, RE α y PCNA fueron localizados en el núcleo celular, mientras que IFNAR2, OXTR y COX-2 fueron localizados en el citoplasma (Fig. 1). Cuando los anticuerpos específicos fueron sustituidos por una IgG no inmune, la ausencia de tinción confirmó la alta especificidad de la inmunotinción (Fig. 1F).

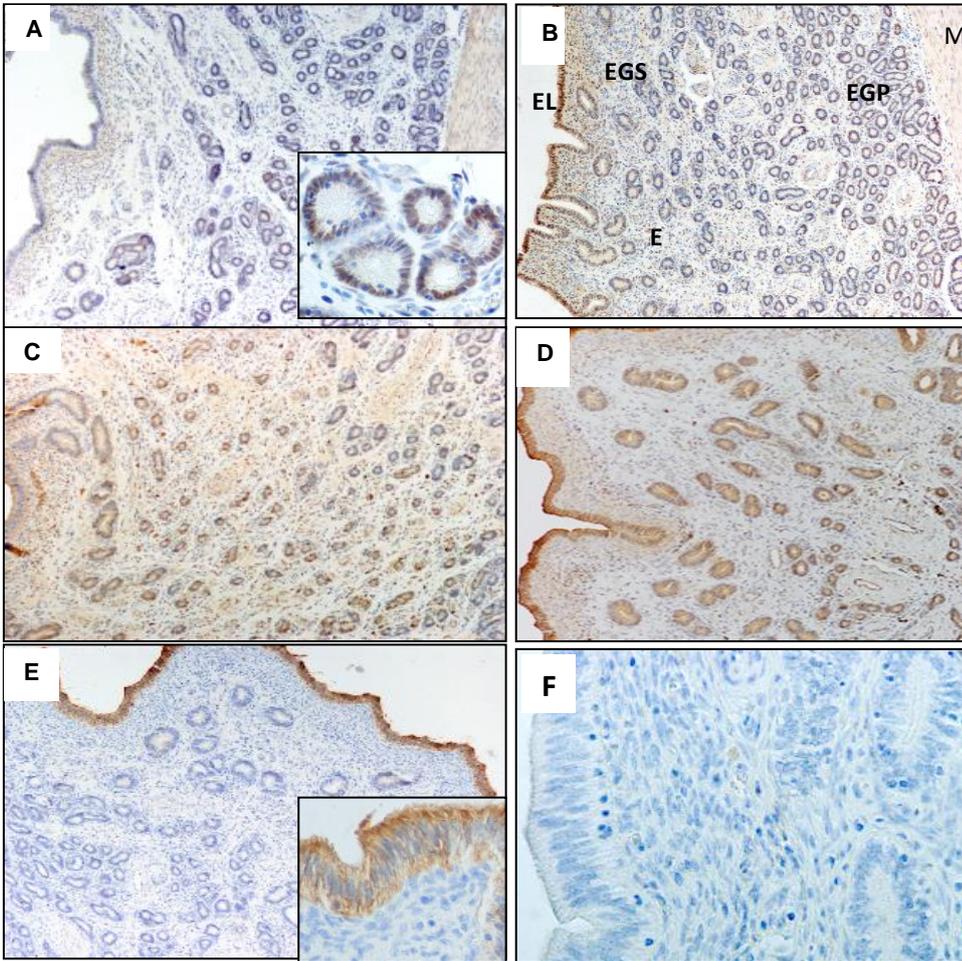


Figura 1. Inmunomarcado endometrial de (A) receptor de progesterona (PR), (B) receptor de estrógeno α ($ER\alpha$), (C) receptor de oxitocina (OXTR), (D) receptor de interferón tipo 1 subunidad 2 (IFNAR2) y (E) ciclooxigenasa 2 (COX-2) (Aumento:100X) al día 14 (día 0=estro) en ovejas alimentadas con una dieta 0.5 (Subnutridas) o 1 (Control) veces los requerimientos de mantenimiento. EL = epitelio luminal, EGS = epitelio glandular superficial, EGP = epitelio glandular profundo, E = estroma, M = miometrio. Cuando se sustituyeron los anticuerpos específicos, la ausencia de inmunomarcado confirmó la especificidad de la tinción (F, 400X).

Aislamiento y transcripción reversa de ARN

El ARN total fue extraído del útero utilizando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguido de la precipitación con cloruro de litio para remover los inhibidores de la síntesis de ADNc y tratamiento con DNase con el kit DNA-Free (Ambion, Austin, TX, USA) para remover la contaminación de ADN. La concentración de ARN se determinó mediante la medición de la absorbancia a 260 nm, determinando la pureza con la relación de absorbancia de 260/280 nm (A260/280) y la integridad mediante electroforesis (gel de agarosa al 1%). Todas las muestras presentaron relaciones A260/280 entre 1.8 y 2.1. Para cada muestra, el ADNc se sintetizó mediante transcripción reversa (RT) utilizando el kit de SuperScript III (Invitrogen) con random primers y 1 µg total de ARN como molde.

PCR en tiempo real cuantitativo

Se determinó la expresión génica mediante PCR en tiempo real utilizando el equipo Rotor-Gene TM 6000 de 72 discos (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia). Fueron utilizados primers diseñados específicamente para amplificar ADNc de RP, OXTR, COX-2 e IFNAR2, sobre la base de secuencias de nucleótidos ovinos avalados por NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Marzo 2009). La secuencia para los primers de RE α , IGF-I, IGF-II e IGF-1R se obtuvieron de la literatura (Pfaffl y col., 2002; Schams y col., 2003; Wu y col., 2004). Como control endógeno se usó la proteína ribosomal ovina L19 (RPL19), usando la secuencia del primer de Chen y col. (2006) dado que mediante un estudio piloto, se probó la expresión del gen RPL19 bajo nuestras condiciones y demostró ser un buen control endógeno ya que tenía una variación mínima entre individuos y tratamientos. En la tabla 1 se describe la secuencia de los primers utilizados. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron utilizando SYBR Green master mix (Quantimix EASY SYG kit; Biotools BandM Laboratories, Madrid, Spain), cantidades equimolares de primers forward y reverse (500 nM; Operon Biotechnologies GmbH, Colonia, Alemania) y 3 µl de ADNc diluido (1:7.5 en agua libre de ARNasa / ADNasa-agua pura) en un volumen final de 20 µl. Las muestras se analizaron por duplicado. Las condiciones estándar de amplificación que se usaron fueron 10 min a 95° C y 40 ciclos de 15 s a 95° C, 60 s a 60° C y 20 s a 72° C. Al final de cada corrida, se analizaron las curvas de disociación para asegurar la detección del amplicón deseado y para descartar ADN contaminante o los dímeros de cebadores. Las muestras de ADNc de doce ovejas se agruparon para proporcionar un control exógeno, y se utilizaron cinco diluciones (de 100 a 6,25 ng / tubo) de este grupo para realizar la regresión lineal para cada gen. La eficiencia (E) de los ensayos se calculó de acuerdo a la fórmula $E = (10^{-1 / \text{pendiente}} - 1)$ (Rutledge y Cote, 2003). La expresión génica se determinó por cuantificación relativa (Pfaffl, 2009) al control exógeno y se normalizó a la expresión media geométrica del gen de control endógeno (RPL19), teniendo en cuenta las eficiencias respectivas (Pfaffl, 2009).

Tabla 1. Secuencia de primers y tamaño esperado del producto utilizados para el ensayo de RT-PCR en tiempo real.

Gen*	Número acceso	Secuencia de primers	Longitud (pb)	Fuente
<i>RP</i>	Z66555	F GACAGCACTTTCTAAGGCGACAT R TGTGCTGGAAGAAACGATTGC	79	**
<i>REα</i>	AY033393	F AGGGAAGCTCCTATTTGCTCC R CGGTGGATGTGGTCTTCTCT	234	(Schams y col., 2003)
<i>OXTR</i>	NM_001009752	F ACGCTCGCCGTCTACATTGT R GCCGTAAGTTCTGCCAGATCTT	85	**
<i>COX-2</i>	NM_001009432	F CCAGGCACAAATCTGATGTT R TGGTCCCTCGTTCAATATCTGTCT	82	**
<i>IFNAR2</i>	NM_001009342	F ACATTCAGCAGGGTTCATAGCA R TTTCTGTGGCTTTTCTGGTCTTC	89	**
<i>IGF-I</i>	NM_001077828	F CCAGACAGGAATCGTGGATG R ACTTGGCGGGCTTGAGAG	89	(Wu y col., 2002)
<i>IGF-II</i>	*	F GACCGCGGCTTCTACTTCAG R AAGAACTTGCCACGGGGTAT	205	(Pfaffl y col., 2002)
<i>IGF-1R</i>	*	F TTAAAATGGCCAGAACCTGAG R ATTATAACCAAGCCTCCAC	314	(Pfaffl y col., 2002)
<i>RPL19</i>	AY158223	F CCCCAATGAGACCAATGAAATC R CAGCCCATCTTTGATCAGCTT	119	(Chen y col., 2006)

RP, receptor de progesterona; RE α , receptor de estrógeno α ; OXTR, receptor de oxitocina; COX-2, ciclooxigenasa-2; IFNAR2, receptor de interferón tipo 1 subunidad 2; IGF, factor de crecimiento insulino dependiente; IGF-1R, receptor de IGF-I; RPL19, proteína ribosomal ovina L19. * cebadores de múltiples especies. **diseñados sobre la base de secuencias de nucleótidos ovinos abalados por NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, accessed Marzo 2009).

Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software SAS (versión 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) en un diseño aleatorio y con una disposición factorial de 2x2 entre tratamiento nutricional y estado reproductivo. La expresión de transcritos y el inmunomarcado se analizaron por ANOVA mediante un procedimiento mixto, incluyendo en todos los casos el tratamiento nutricional (subnutrido o control), estado reproductivo (cíclicas o preñadas) y su interacción como efectos fijos. En el modelo que estudió los datos de inmunohistoquímica se incluyó también los efectos fijos del tipo celular (epitelio luminal, epitelio glandular y estroma), la localización (superficial y profundo) y sus interacciones. Los datos se presentan como la media de mínimos cuadrados \pm errores estándares. Las diferencias entre las medias se consideran significativas cuando $P < 0.05$, y la tendencia cuando $P \leq 0.10$.

RESULTADOS

Localización y abundancia tisular de proteínas

Los efectos del tratamiento nutricional, estado reproductivo y su interacción en cada variable se muestran en la Tabla 2.

En general, la preñez disminuyó la inmunotinción para RP ($P < 0.05$). En ovejas cíclicas subnutridas, el 12% de las células del EL fueron positivas para RP con una baja intensidad de tinción, pero en el resto de los grupos no se observó tinción positiva para RP en el EL. De forma similar, en ovejas cíclicas, la subnutrición tendió ($P < 0.1$) a aumentar la intensidad de tinción para RP en el EGP (Fig. 2). La mayor intensidad de tinción para RP se observó en las glándulas profundas, mientras que la tinción más leve se observó en EL, EGS y EP.

Respecto a RE α , en las ovejas controles, la preñez tendió a disminuir la inmunotinción en el EP, mientras que, en ovejas subnutridas preñadas, la misma tendencia fue observada en EL ($P < 0.1$, Fig.2). A su vez, la subnutrición tendió a aumentar RE α en el EL de ovejas cíclicas y en el ES de ovejas preñadas ($P < 0.1$, Fig.2). En general, se observó menos RE α en el EP que en el resto de los tipos celulares ($P < 0.05$).

La preñez aumentó la abundancia del OXTR, pero esto fue evidente solamente en el EP del grupo control ($P < 0.05$, Fig.2). A su vez, en el EP de los animales preñados, la subnutrición disminuyó la expresión del OXTR ($P < 0.01$, Fig.2). Se pudo observar que en general, la intensidad de tinción para el OXTR fue mayor en el estroma que en los epitelios ($P < 0.05$).

La tinción específica para COX-2 fue observada casi exclusivamente en el EL y con una proporción muy alta de tinción celular (>97%) en todos los grupos. En este tipo celular, no se observó efecto de la nutrición, de la preñez o de su interacción. Además, el EGS presentó pocas células positivas a COX-2 (<8%) y con una débil tinción en todos los grupos.

La intensidad de tinción para IFNAR2 fue afectada por el estado reproductivo, disminuyendo su expresión en las ovejas preñadas ($P < 0.01$). A su vez, hubo una interacción entre el tratamiento nutricional y el estado reproductivo sobre la expresión de IFNAR2 ($P < 0.05$): en ovejas controles, la preñez disminuyó la intensidad de tinción en todos los tipos celulares menos en el EL; mientras que en ovejas subnutridas la preñez aumentó la intensidad de tinción solo en el EL (Fig.3). Además, la subnutrición disminuyó la intensidad de tinción ($P < 0.05$) de IFNAR2 en el EP de ovejas cíclicas. La mayor expresión de IFNAR2 la presentó el EL, mientras que la menor expresión de esta proteína se observa en el estroma.

La intensidad de tinción para PCNA no se afectó por el tratamiento nutricional, el estado reproductivo o su interacción. Sin embargo, se observó un aumento en la tinción del PCNA en el EL de ovejas controles preñadas ($P < 0.05$; Fig.3).

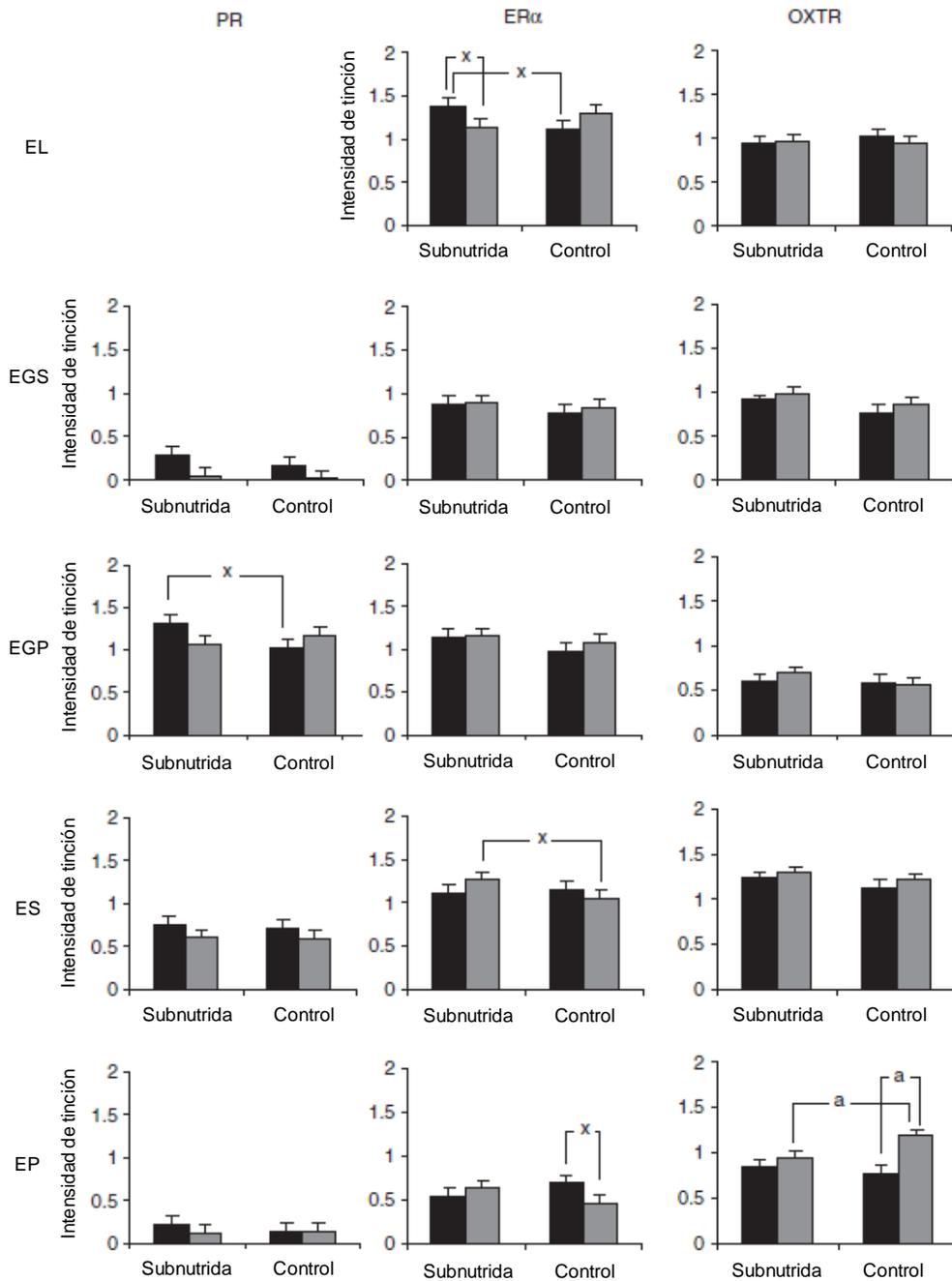


Figura 2. Intensidad de tinción endometrial del receptor de progesterona (RP), receptor de estrógeno α (RE α) y receptor de oxitocina (OXTR) al día 14 (día 0=estro) en ovejas cíclicas (barras negras) o preñadas (barras grises) alimentadas con una dieta de 0.5 (Subnutrida) y 1 (Control) veces los requerimientos de mantenimiento. EL=epitelio luminal, EGS=epitelio glandular superficial, EGP=epitelio glandular profundo, ES=estroma superficial, EP=estroma profundo. Los datos se presentan como la media de mínimos cuadrados \pm error estándar. ^a $P < 0.05$; ^x $P < 0.1$.

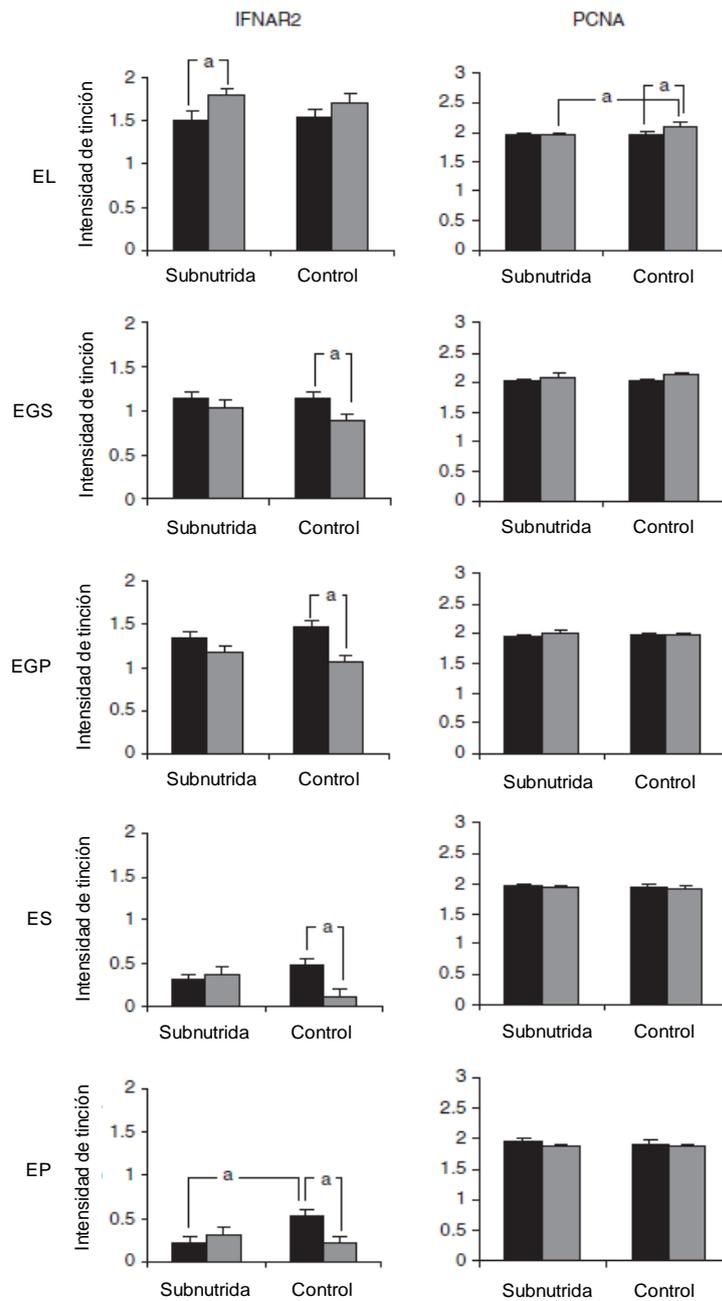


Figura 3. Intensidad de tinción endometrial para IFNAR2 y PCNA al día 14 (día 0=estro) en ovejas cíclicas (barras negras) o preñadas (barras grises) alimentadas con una dieta de 0.5 (Subnutrida) y 1 (Control) veces los requerimiento de mantenimiento. EL=epitelio luminal, EGS=epitelio glandular superficial, EGP=epitelio glandular profundo, ES=estroma superficial, EP=estroma profundo. Los datos se presentan como la media de mínimos cuadrados \pm error estándar. ^a $P < 0.05$.

Expresión endometrial de transcritos

Los efectos del tratamiento nutricional, el estado reproductivo y su interacción sobre la expresión génica endometrial se muestran en la Tabla 2 y el nivel de expresión de los genes target se muestran en la Fig.4.

La expresión génica de RP presentó una tendencia ($P=0.07$) en la interacción entre el tratamiento nutricional y el estado reproductivo. La subnutrición tendió ($P=0.08$) a aumentar la expresión del gen RE α , siendo evidente este efecto en las ovejas cíclicas. La expresión del ARNm de OXTR no se vió afectada ni por el tratamiento nutricional ni por el estado reproductivo; pero los niveles de expresión del ARNm de OXTR fueron los más altos, junto con la expresión del ARNm de COX-2. Además, en general, la subnutrición disminuyó la expresión del gen de COX-2 en un 49% ($P=0.05$). En el grupo subnutrido, la preñez aumentó la expresión del gen de IFNAR2 ($P<0.05$), pero no se observaron cambios en la expresión génica de IFNAR2 en ovejas del grupo control.

Por otro lado, la preñez aumentó ($P<0.05$) la expresión del ARNm de IGF-I en ovejas de ambos grupos nutricionales, pero no se observó efecto del tratamiento nutricional. La expresión del gen de IGF-II fue 10 veces mayor que la observada para la expresión génica de IGF-I e IGF-1R. Se encontró una interacción entre el tratamiento nutricional y el estado reproductivo sobre la expresión génica de IGF-II ($P<0.05$): la preñez aumentó la expresión del ARNm de IGF-II en ovejas del grupo control, mientras que no se observó ningún efecto en el grupo subnutrido. A su vez, la subnutrición aumentó ($P<0.05$) la expresión del ARNm de IGF-II en ovejas cíclicas, pero no se observaron diferencias entre ovejas preñadas. El nivel de expresión del ARNm de IGF-1R no se vio afectado por el tratamiento nutricional, el estado reproductivo ni por su interacción.

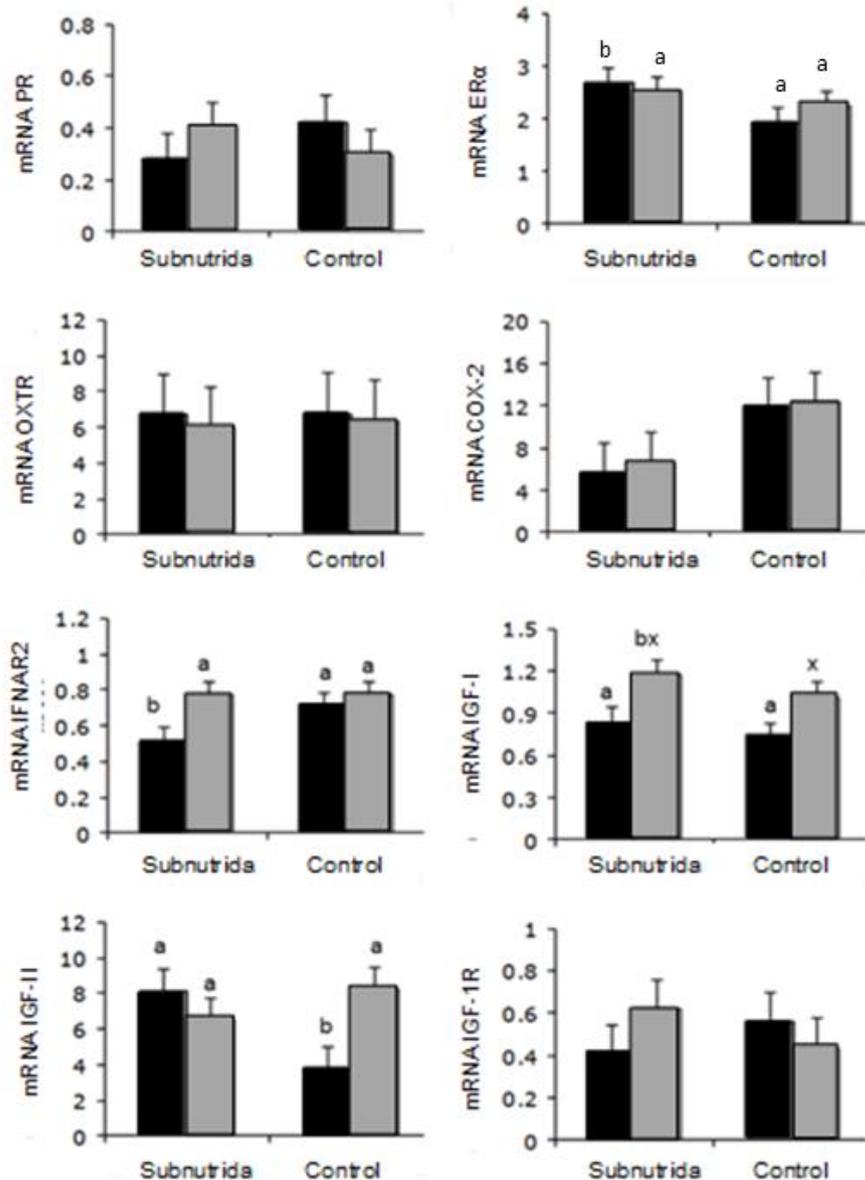


Figura 4. Niveles de expresión (normalizados por RPL19) de los transcritos de RP, RE α , OTRX, COX-2, IFNAR2, IGF-I, IGF-II e IGF-1R, al día 14 (día 0= estro) en el útero de ovejas cíclicas (barras negras) o preñadas (barras grises) alimentadas con una dieta de 0.5 (Subnutrida) y 1 (Control) veces los requerimientos de mantenimiento. Diferentes letras indican diferencias dentro del mismo gráfico, *a,b*: $P < 0,05$; *a,x*: $P \leq 0,1$

Tabla 2. Efectos del tratamiento nutricional (control y subnutridas), del estado reproductivo (preñadas y cíclicas) y su interacción sobre la abundancia de proteínas endometriales (intensidad de tinción) y la expresión del ARNm de las variables estudiadas en el útero ovino el día 14 (día 0=estro).

	Subnutridas	Preñadas	Interacción
Proteínas			
RP	NS	P<0.05	NS
RE α	P<0.1	NS	NS
OXTR	NS	P<0.05	NS
COX-2	NS	NS	NS
IFNAR2	NS	P<0.01	P<0.05
PCNA	NS	NS	NS
ARNm			
RP	NS	NS	P=0.07
Re α	P=0.08	NS	NS
OXTR	NS	NS	NS
COX-2	P=0.05	NS	NS
IFNAR2	NS	P<0.05	NS
IGF-I	NS	P<0.05	NS
IGF-II	NS	NS	P<0.05
IGF-1R	NS	NS	NS

Variables de estudio: receptor de progesterona (RP); receptor de estrógeno α (RE α); receptor de oxitocina (OXTR); ciclooxigenasa 2 (COX-2); receptor del interferon-t subunidad 2 (IFNAR2); factor insulino dependiente tipo I/II (IGF-I/II) y su receptor tipo 1 (IGF-1R). P<0.05; P \leq 0.1, NS = no significativo.

DISCUSIÓN

En la presente tesis se investigó el efecto de la gestación y de la subnutrición sobre la localización, abundancia y expresión génica uterina de factores involucrados en el reconocimiento materno y en la preparación del ambiente uterino para la gestación (día 14 de preñez o de ciclo estral) en ovejas adultas. Cabe destacar, que el artículo correspondiente a esta tesis se publicó hace 10 años, y posteriormente y con el objetivo de evaluar si la presencia del embrión inducía cambios en el transcriptoma uterino de manera dependiente del plano nutricional, se continuó investigando. Es así que de Brun y col., 2020 utilizando metodologías que permiten el estudio masivo de expresión génica (microarreglos) obtuvo hallazgos novedosos en la misma propuesta experimental que la contenida en esta tesis (presencia del embrión y efecto de la subnutrición al momento del reconocimiento materno de la preñez (día 14). No ha habido otros reportes al respecto en ovinos, y dada la secuencia de hallazgos (la presente tesis de grado fue el antecedente de Brun y col., 2020, estos hallazgos serán brevemente discutidos.

Efecto del estado reproductivo (cíclicas vs. preñadas)

Como ya ha sido reportado, en ovejas cíclicas, la exposición continua del útero a la progesterona produce una regulación negativa sobre los RP a nivel del epitelio luminal y glandular al final de la fase luteal, permitiendo de esta forma el aumento de los niveles del RE α y del OXTR, y desencadenando la liberación de oxitocina, la cual induce la generación de pulsos de PGF2 α , causando de esta manera, la regresión del CL (Spencer y col., 2004a). Los resultados hallados en esta tesis en ovejas cíclicas controles, son consistentes con lo descrito fisiológicamente respecto al desencadenamiento de la luteólisis: el EL de este grupo de ovejas se observó totalmente desprovisto de RP, y a su vez se observaron niveles relativamente altos de RE α , OXTR y COX-2, junto con una alta secreción uterina de PGF2 α in vitro (Sosa y col., 2009b). Además, estos hallazgos concuerdan con los resultados observados respecto a la expresión de transcritos en este mismo grupo de ovejas: la expresión del ARNm de RP fue aproximadamente 10, 20 o 40 veces menor que la de la expresión de los genes de RE α , OXTR y COX-2, respectivamente.

A su vez, la alta expresión de RE α observada en ovejas cíclicas, coincide con otros estudios en los cuales reportan que la mayoría de los tipos celulares expresan estos receptores ya sea alrededor o en el día 14 del ciclo estral (Cherny y col., 1991; Spencer y Bazer 1995), siendo esto consistente con los altos niveles de expresión de OXTR encontrados, dado que los estrógenos inducen la formación de OXTR (Spencer y col., 2004a). En este estudio, la proteína del OXTR fue detectada en todos los tipos celulares estudiados. Del mismo modo, otros autores observaron también en ovejas cíclicas, altos niveles de la proteína y del gen de OXTR en el epitelio del endometrio durante la fase luteal tardía (Wathes y Hamon 1993; Stevenson y col., 1994b; Spencer y col., 1998). Por otro lado, aunque en esta tesis se detectaron algunas células positivas para COX-2 en el epitelio glandular superficial (8% de células positivas con muy baja intensidad de tinción en ovejas cíclicas del grupo control), COX-2 se localizó casi exclusivamente a nivel del epitelio luminal, en concordancia con otros reportes (Charpigny y col., 1997).

Como fue mencionado previamente, cuando el embrión está presente en el útero, debe ser capaz de prevenir la luteólisis para asegurar la secreción continua de progesterona. Esto lo logra secretando IFN-T, el cual se une al IFNAR en el epitelio luminal y glandular superficial del endometrio, evitando de esta forma la secreción de PGF2 α (Spencer y col., 2004a). En este sentido, en las ovejas preñadas, la mayor expresión de IFNAR2 se observó en el EL y en las glándulas, lo que concuerda con el estudio de Rosenfeld y col. (2002), quienes a través de la inmunohistoquímica demostraron que estas células son las células blanco para IFN-T durante la preñez. Aunque no se encontraron diferencias en la expresión génica de IFNAR2 entre ovejas cíclicas y preñadas del grupo control, es interesante el hecho de que la preñez afectó la expresión de la proteína IFNAR2 de manera específica para el tipo celular en este mismo grupo (control): se observó una clara regulación negativa del embrión sobre IFNAR2 tanto en el epitelio glandular como en el estroma, independientemente de su localización (superficial o profundo), pero no en el epitelio luminal, que es el tipo celular más íntimamente relacionado con el embrión.

En relación al receptor de progesterona en ovejas preñadas, este permaneció con baja expresión o ausente en el EL, concordando con la falta de sensibilidad a la progesterona en este tipo celular durante la preñez temprana en rumiantes (Wathes y Hamon 1993; Spencer y Bazer 1995; Kimmins y MacLaren 2001). Sin embargo, los resultados relacionados al efecto de la preñez sobre la expresión de RE α son contradictorios. Si bien, otros autores han reportado una pérdida total de RE α en el epitelio glandular superficial y luminal al día 13 de la gestación en ovejas (Wathes y Hamon 1993; Spencer y Bazer 1995), en esta tesis pudimos observar expresión de RE α en todos los tipos celulares estudiados. Esta aparente discrepancia puede deberse a la elección de diferentes anticuerpos utilizados en la inmunohistoquímica, y por lo tanto a sus diferentes epítopes. Por su parte, PCNA es una proteína accesoria de la ADN polimerasa y su expresión se correlaciona con la proliferación celular (Waseem y Lane 1990). La extensa y homogénea expresión de PCNA observada a lo largo del endometrio, no parece indicar un incremento en la actividad específica del tipo celular, como se ha observado en útero ovino neonatal (Taylor y col., 2000), pero si una gran proliferación para sustentar el funcionamiento de un tejido adulto que experimenta cambios regulares. El aumento en la expresión de PCNA observado en el EL de ovejas preñadas del grupo control, podría representar una resistencia del útero contra la invasión de un tejido extraño, el trofoblasto, como se sugiere a nivel del endometrio humano (Demir y col., 2002).

Durante el establecimiento de la preñez, la inhibición del incremento de OXTR, y la concomitante reducción de la secreción de PGF2 α , parecen ser los eventos determinantes para prolongar la vida del CL (Spencer y col., 2004a). Sin embargo, en el presente estudio, ni la expresión génica ni la abundancia endometrial de la proteína de OXTR presentaron diferencias entre ovejas preñadas y cíclicas. Dado que la presencia de la proteína receptora no le confiere necesariamente capacidad de respuesta al tejido, puede ser factible que en este estudio, la capacidad de unión del receptor haya sido alterada por la preñez, o que el nivel de expresión del OXTR no sea un factor determinante en la iniciación de la luteólisis o del reconocimiento materno de la gestación. De hecho, se ha sugerido que la secreción luteolítica de PGF2 α en el ganado no depende directamente de la oxitocina ovárica (Kotwica y col., 1998). Por su parte, la preñez no alteró la expresión del ARNm de COX-2 en el útero ovino. En este sentido, Charpigny y col., (1999) evidenciaron que la preñez no tuvo

ningún efecto sobre la secreción de PGF2 α en ovejas, y también se ha reportado que la expresión endometrial de COX-2 permaneció sin cambios con la preñez (Charpigny y col., 1997,1999) o que disminuye después de la administración de IFN-T (Chen y col., 2006). Se ha reportado que el IFN-T reduce la expresión de la PGF sintasa, una enzima que actúa debajo de la COX-2 en la cascada de síntesis de PGF2 α , (Arosh y col., 2004), siendo esta una posible explicación para la disminución de las concentraciones de PGF2 α (Sosa y col., 2009b), sin ningún cambio a nivel de la COX-2 en las ovejas gestantes de esta tesis. Por otro lado, se ha demostrado que la PGE2 está relacionada con la receptividad uterina, la quiescencia del miometrio y tienen un efecto antiluteolítico o luteoprotector (Arosh y col., 2004). Sosa y col. (2009b) no observaron diferencias entre los distintos grupos nutricionales sobre la concentración endometrial de PGE2 en ovejas preñadas, pudiendo relacionar estos resultados con el hecho de que los productos de secreción del embrión pueden estimular su síntesis endometrial (Asselin y col., 1997b).

Se ha demostrado que IGF-I e IGF-II, actuando principalmente a través de IGF-1R, promueven el crecimiento y la diferenciación de células embrionarias y endometriales (Kaye 1997; Wathes y col., 1998). Consistentemente, la preñez aumentó la expresión uterina del ARNm de IGF-I e IGF-II en ovejas del grupo control, siendo la expresión del ARNm de IGF-II cuantitativamente mayor que la del ARNm de IGF-I (casi 10 veces más). Estos resultados concuerdan con estudios de hibridación in situ realizados en ovinos (Wathes y col., 1998) y con las mayores concentraciones de IGF-II encontradas en fluido uterino (Ko y col., 1991). Sin embargo, Stevenson y col. (1994a) no observaron ningún efecto de la preñez en los días 14-15 sobre la expresión del ARNm de IGF-II, determinado por hibridación in situ.

Los posteriores estudios realizados por de Brun (2019) demostraron que la presencia del embrión afectó la expresión de 85 genes en animales controles y 38 en animales subnutridos. La expresión de genes relacionados con las vías del sistema inmune se encontraron estimulados en ovejas preñadas cuando se compararon con las cíclicas. Más aún, la presencia del embrión aumentó transportadores de nutrientes en el endometrio, lo que sugiere un mayor flujo de nutrientes. También, en estos genes, el estímulo dado por la presencia del embrión fue menor en animales subnutridos que controles. Estas diferencias del grado de expresión acorde al embrión de vías metabólicas estratégicas en controles y subnutridas (menor en subnutridas) es consistente con la mayor muerte embrionaria en animales subnutridos (de Brun y col., 2020).

Efecto del tratamiento nutricional (controles vs. subnutridas)

La subnutrición afectó la expresión uterina de ciertos genes en ovejas cíclicas, pero no en ovejas preñadas. Las ovejas subnutridas cíclicas, fue el único grupo en el que se detectó en algunas células del EL, inmunotinción positiva a RP, pero con intensidad de tinción débil. El RP es considerado un marcador de la acción de los estrógenos y, consistentemente, en este grupo de animales se observó una tendencia hacia la mayor expresión de los niveles tanto de la proteína como del ARNm del RE α . Sumado a esto, la subnutrición disminuyó la expresión del ARNm de IFNAR2 en ovejas cíclicas. Por lo tanto, estas diferencias en su conjunto, parecen indicar un

entorno uterino más propenso a la ocurrencia de la luteólisis en este grupo animal (ovejas cíclicas subnutridas).

También se observaron cambios en la expresión de la proteína IFNAR2: en ovejas controles, la preñez disminuyó la expresión de IFNAR2 en las glándulas y el estroma del endometrio, sin ser afectada la expresión de esta proteína a nivel del EL; mientras que en las ovejas subnutridas las diferencias en la expresión de IFNAR2 solo se observaron en el EL, en función del estado reproductivo de los animales (ovejas cíclicas subnutridas presentaron menor expresión de IFNAR2 que las preñadas). Es claro que hay una alteración del patrón de expresión de IFNAR2, es decir, de la sensibilidad al IFN-T, en respuesta a la subnutrición. La activación de la cascada de señalización intra-celular del IFN-T en los epitelios luminal y glandular, resulta en la producción de un factor de transcripción negativo, el IRF-2 (Spencer y col., 1998). Se cree que el IRF-2, cuya presencia en los epitelios se detecta al menos un par de días después de la exposición endometrial al IFN-T, es el responsable de la inhibición en la síntesis del ER y el OTR (Spencer y col., 1998). En las ovejas gestadas subnutridas, los mayores contenidos de IFNAR2 en el epitelio luminal comparado con las ovejas cíclicas, podrían explicar el menor contenido de ER α en el epitelio luminal, aunque no se observó diferencia en el contenido de OTR.

En general, la expresión del ARNm de COX-2 fue fuertemente reducida por la subnutrición (en casi un 50%), pero cuando se consideró la interacción entre el estado reproductivo y el tratamiento nutricional, no se observaron diferencias significativas entre los grupos, probablemente debido a la alta variación dentro de cada grupo. Sin embargo, la disminución de la expresión de COX-2 observada en ovejas subnutridas, es consistente con la disminución de la secreción endometrial de PGE2 (hormona antiluteolítica) observada en las ovejas cíclicas pertenecientes al grupo de los animales subnutridos (Sosa y col., 2009b).

Por otro lado, dado a que la subnutrición reduce las concentraciones plasmáticas y la síntesis hepática de IGF-I (Thissen y col., 1994; Sosa y col., 2006, 2009a), en esta tesis esperábamos observar una alteración de la expresión endometrial y/o de la sensibilidad a esta hormona asociada al tratamiento nutricional. Sin embargo, la subnutrición no afectó la expresión endometrial de IGF-I o IGF-1R, pero, en ovejas cíclicas, se duplicó la expresión uterina del ARNm de IGF-II. No obstante, otros autores reportan en ovejas cíclicas al día 5, que la subnutrición disminuyó la expresión uterina de IGF-I y la expresión en oviducto de IGF-II (de Brun y col., 2013).

Finalmente, es importante hacer referencia al hecho de que en este estudio, la restricción nutricional fue efectiva en términos de reducción de condición corporal y peso vivo (10% y 15% respectivamente); además, el grado de pérdida de reservas corporales fue similar a la reportada en trabajos anteriores (Lozano y col., 1998; Sosa y col., 2006) y se reflejó en los perfiles endocrinos observados (Sosa y col., 2009a). Sin embargo, como hemos comentado anteriormente, parece haber sido suficiente para modificar la expresión de algunos de los genes estudiados en las ovejas cíclicas, siendo sorprendente el hecho de que la expresión génica endometrial de ovejas preñadas no se vio afectada por la subnutrición. Incluso en los casos en que la subnutrición cambió la expresión génica en las ovejas cíclicas (por ejemplo, IFNAR2 e IGF-II), de alguna manera estas diferencias se anularon cuando un embrión estaba presente en el útero. Estas observaciones en su conjunto sugieren una capacidad de

adaptación del sistema embrionario-materno a los cambios adversos en el estado metabólico.

Acorde a estos resultados, podemos sugerir que frente a la presencia del embrión, se atenúan los cambios que provoca la subnutrición sobre el endometrio, logrando que el embrión señalice su presencia a la madre y evitando de esta forma que se produzca la luteólisis. Estudios posteriores realizados por de Brun (2019) mostraron que la subnutrición afectó genes claves del metabolismo celular, y que la adaptación del útero al embrión dependió del plano nutricional, lo que refleja una respuesta adaptativa a la restricción nutricional y al uso diferencial de nutrientes.

CONCLUSIONES

- La subnutrición no provocó cambios notorios en el contenido endometrial de RP, RE α , OTRX, IFNAR2 y COX-2 en ovejas cíclicas o gestantes determinados por inmunohistoquímica el día 14 del ciclo estral o de la gestación.
- La subnutrición afectó la expresión génica uterina de RP, RE α y del IFNAR2 a favor de los mecanismos luteolíticos, solamente en ovejas cíclicas.
- La gestación provocó una disminución del contenido de IFNAR2 en las glándulas y el estroma de ovejas controles, sin cambios en la expresión en el epitelio luminal.
- Las ovejas preñadas subnutridas presentaron similar expresión génica uterina que las ovejas controles.
- En esta tesis no se observó un efecto significativo del tratamiento nutricional sobre el reconocimiento materno de la gestación al día 14 de la preñez, pero sí de la presencia del embrión.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Abecia JA, Forcada F, Palacín I, Sanchez-Prieto L, Sosa C, Fernández-Foren A, Meikle A (2013). Undernutrition affects embryo quality of superovulated ewes. *Zygote* 9: 1-9.
- 2) Abecia, J. A., Sosa, C., Forcada, F., and Meikle, A. (2006). The effect of undernutrition on the establishment of pregnancy in the ewe. *Reprod.Nutr. Dev.* 46: 367–378.
- 3) Abecia JA, Forcada F, Lozano JM (1999a). A preliminary report on the effect of dietary energy on prostaglandin F2 alpha production in vitro, interferon-tau synthesis by the conceptus, endometrial progesterone concentration on days 9 and 15 of pregnancy and associated rates of embryo wastage in ewes. *Theriogenology* 52: 1203-13.
- 4) Abecia JA, Lozano JM, Forcada F (1999b). A preliminary study on the effects of dietary energy and melatonin on the ex vivo production of progesterone and prostaglandin F2Y by the corpora lutea and endometrial tissue of ewes. *Vet Res Comm* 23: 115-121.
- 5) Abecia, JA, Lozano JM, Forcada F, Zarazaga L. (1997). Effect of level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day eight of pregnancy in Rasa Aragonesa ewes. *Anim.Reprod.Sci.* 48: 209–218.
- 6) Abecia JA, Rhind SM, Bramley TA, Mcmillen SR (1995). Steroid production and LH receptor concentrations of ovarian follicles and corpora lutea and associated rates of ova wastage in ewes given high and low levels of food intake before and after mating. *Anim Sci* 61: 57-62.
- 7) Agricultural and Food Research Council (1993). Energy and Protein Requirements of Ruminants. An Advisor Manual Prepared by the AFRC Technical Committee on Responses to Nutrients. Wallingford, CAB International, 159 p.
- 8) Ashworth CJ (1995). Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. *Livest Prod Sci* 44: 99-105.
- 9) Asselin E, Drolet P, Fortier MA (1997a). Cellular Mechanisms Involved during Oxytocin-Induced Prostaglandin F2 {alpha} Production in Endometrial Epithelial Cells in Vitro: Role of Cyclooxygenase-2. *Endocrinology* 138: 4798-4805.
- 10) Asselin E, Lacroix D, Fortier MA (1997b). IFN-tau increases PGE2 production and COX-2 gene expression in the bovine endometrium in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 132: 117-26.
- 11) Arosh J A, Banu SK, Kimmins S, Chapdelaine P, Maclaren L A, Fortier M A (2004). Effect of interferon-tau on prostaglandin biosynthesis, transport, and

signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E₂. *Endocrinology* 145: 280–5293.

12) Azzarini M (2002) Potencial reproductivo de los ovinos. X Congreso Latinoamericano de Buiatría. Paysandú, Uruguay pp. 123-130.

13) Bathgate RA, Tillmann G, Ivell R (1998). Molecular mechanisms of bovine oxytocin receptor gene regulation. *Biology Reprod* 58: 160.

14) Bazer FW, Spencer TE, Ott TL (1997). Interferon Tau: A Novel Pregnancy Recognition Signal. *Am J Reprod Immunol* 37: 412-420.

15) Blache D, Zhang S, Martin GB (2006). Dynamic and integrative aspects of the regulation of reproduction by metabolic status in male sheep. *Reprod Nutr Dev.* 46(4): 379-390.

16) Boos A, Meyer W, Schwarz R, Grunert E (1996). Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 44: 11–21.

17) Buhi WC (2002). Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* 123: 355-62.

18) Buhi WC, Alvarez IM, Kouba AJ (1997). Oviductal regulation of fertilization and early embryonic development. *J Reprod Fertil (Suppl 52)*: 285-300.

19) Burns PD, Tsai SJ, Wiltbank MC, Hayes SH, Graf GA, Silvia WJ (1997). Effect of Oxytocin on Concentrations of Prostaglandin H Synthase-2 mRNA in Ovine Endometrial Tissue in Vivo. *Endocrinology* 138: 5637-5640.

20) Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ (2002). Regulación de la apoptosis en el blastocisto bovino por la insulina y la superfamilia del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF). *Reproducción y desarrollo molecular*, 62 (4): 489-495.

21) Charpigny G, Reinaud P, Creminon C, Tamby JP (1999). Correlation of increased concentration of ovine endometrial cyclooxygenase 2 with the increase in PGE₂ and PGD₂ in the late luteal phase. *J. Reprod. Fertil.* 117: 315–324.

22) Charpigny G, Reinaud P, Tamby JP, Creminon C, Martal J, Maclouf J, Guillomot M (1997). Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in ovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology* 138: 2163–2171.

23) Chen Y, Green JA, Antoniou E, Ealy AD, Mathialagan N, Walker AM, Avalle MP, Rosenfeld CS, Hearne LB, Roberts RM (2006). Effect of interferon-τ

administration on endometrium of nonpregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. *Endocrinology* 147: 2127–2137.

24) Cherny RA, Salamonsen LA, Findlay JK (1991). Immunocytochemical localization of oestrogen receptors in the endometrium of the ewe. *Reprod. Fertil. Dev.* 3: 321–331.

25) Chilliard Y, Bocquier F, Doreau M (1998). Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reprod Nutr Dev* 38: 131-52.

26) Clark JH, Mani SK (1994) Actions of ovarian steroid hormones. En: Knobil, E. y Neill, J.D. *The Physiology of Reproduction*. New York, Raven, pp. 1011-1046.

27) Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lyndon JP, Mayo FD (2001). Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. *Mol Cell Endocrinol* 179: 97-103.

28) de Brun V, Loor JJ, Naya H, Vailati-Riboni M, Bulgari O, Shahzad K, Abecia JA, Sosa C, Meikle A (2020) The embryo affects day 14 uterine transcriptome depending on nutritional status in sheep a Metabolic adaptation to pregnancy in nourished and undernourished ewes. *Theriogenology*. 146:14-19.

29) de Brun V. (2019) Subnutrición, mortalidad embrionaria y función uterina en ovinos. Tesis. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República, 130 p.

30) de Brun V, Abecia JA, Fernández-Foren A, Carriquiry M, Forcada F, Vazquez I, Meikle A, Sosa C (2013). Undernutrition and laterality of the corpus luteum affects 461 gene expression in oviduct and uterus of pregnant ewes. *Span. J. Agric. Res.* 11: 989–996

31) Demir R, Kayisli UA, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir-Weusten AY, Arici A (2002). Structural differentiation of human uterine luminal and glandular epithelium during early pregnancy: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Placenta* 23: 672–684.

32) Demmers KJ, Derecka K, Flint A (2001). Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction* 121: 41-9.

33) Domanski P, Colamonici OR (1996). El receptor de interferón tipo I. El largo y el corto. *Revisiones de citocinas y factores de crecimiento*, 7 (2): 143-151.

34) Dupont J, Scaramuzzi RJ, Reverchon M (2014). The effect of nutrition and metabolic status on the development of follicles, oocytes and embryos in ruminants. *Animal*, 8 (7): 1031-1044.

- 35) Farin CE, Imakawa K, Roberts RM (1989). In situ localization of mRNA for the interferon, ovine trophoblast protein-1, during early embryonic development of the sheep. *Mol Endocrinol* 3(7) : 1099–1107.
- 36) Fawcett DW (1988) Sistema reproductor femenino. En: Fawcett DW. *Tratado de histología* pp. Madrid, Interamericana-McGraw Hill, pp 909-912.
- 37) Fernández Abella D, Formoso D, Aguerre JJ, Hernández Z, Buzoni G, Galli C, Varela JP, Fernández S (2008). Efecto del tipo y la oferta de forraje y la carga parasitaria previo al servicio sobre la tasa ovulatoria y fecundidad de oveja Corriedale. *Producción Ovina*. 20: 31-40.
- 38) Fleming TP, Kwong WY, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, Miller DJ, Watkins AJ, Eckert JJ (2004). The embryo and its future. *Biol Reprod* 71: 1046-54.
- 39) Gandolfi F, Brevini TA, Moor RM (1989). Effect of oviduct environment on embryonic development. *J Reprod Fertil (Suppl 38)*: 107-15.
- 40) Geisert RD, Morgan GL, Short EC Jr., Zavy MT (1992). Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. *Reprod Fertil Dev* 4: 301-305.
- 41) Gimpl G, Fahrenholz F (2001). The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation. *Physiol. Rev.* 81: 629-683.
- 42) Godkin JD, Bazer FW, Moffatt J, Sessions F, Roberts RM (1982). Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at day 13-21. *J Reprod Fertil* 65: 141-50.
- 43) Goff AK (2004). Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 71:11–16.
- 44) Goff AK (2002). Embryonic signals and survival. *Reprod Domest Anim* 37: 133-9.
- 45) Goodman RL (1994) Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. En: Knobil, E., Neill, J.D. *The Physiology of Reproduction*. New York, Raven, pp. 659-709.
- 46) Graham JD, Clarke CL (1997). Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. *Endocr Rev* 18: 502-519.
- 47) Gray CA, Bartol FF, Taylor KM, Wiley AA, Ramsey WS, Ott TL, Bazer FW, Spencer TH (2000). Ovine uterine gland knock-out model: effects of gland ablation on the estrous cycle. *Biol Reprod*; 62: 448-456.
- 48) Guillomot M, Michel C, Gaye P, Charlier N, Trojan J, Martal J. (1990). Cellular localization of an embryonic interferon, ovine trophoblastin and its

mRNA in sheep embryos during early pregnancy. *Biology Cell*, 68(1-3): 205-211.

49) Hafez ES (1996) Anatomía del aparato reproductor femenino. En: Hafez ES. Reproducción e inseminación artificial en animales. Madrid, Interamericana-McGraw Hill, pp. 20-52.

50) Hansen TR, Imakawa K, Polites HG, Marotti KR, Anthony RV, Roberts RM (1988). Interferon RNA of embryonic origin is expressed transiently during early pregnancy in the ewe. *J Biol Chem* 263: 12801-12804.

51) Hapangama DK, Kamal AM, Bulmer JN (2015). Estrogen receptor β : the guardian of the endometrium. *Hum Reprod Update*, 21(2): 174-193.

52) Harada H, Takahashi E, Itoh S, Harada K, Hori TA, Taniguchi T (1994). Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system. *Mol Cell Biol* 14: 1500-1509.

53) Imakawa K, Anthony RV, Kazemi M, Marotti KR, Polites HG, Roberts RM (1987). Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. *Nature* 330: 377-379.

54) Ivell R, Kimura T, Muller D, Augustin K, Abend N, Bathgate R, Telgmann R, Balvers M, Tillmann G, Fuchs AR (2001). The structure and regulation of the oxytocin receptor. *Exp Physiol* 8: 289-296.

55) Kaye PL (1997). Preimplantation growth factor physiology. *Rev. Reprod.* 2: 121-127.

56) Kimmins S, MacLaren LA (2001). Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta* 22: 742-748.

57) Ko Y, Lee CY, Ott TL, Davis MA, Simmen RC, Bazer FW, Simmen FA (1991). Insulin-like growth factors in sheep uterine fluids: concentrations and relationship to ovine trophoblast protein-1 production during early pregnancy. *Biol. Reprod.* 45: 135-142.

58) Kotwica J, Skarzynski D, Jaroszewski J, Williams GL, Bogacki M (1998). Uterine secretion of prostaglandin F₂alpha stimulated by different doses of oxytocin and released spontaneously during luteolysis in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 38: 217-226.

59) Leese HJ (2005). Rewards and risks of human embryo creation: a personal view. *Reprod Fertil Dev* 17: 387-91.

60) Leese HJ (1995). Metabolic control during preimplantation mammalian development. *Hum Reprod Update* 1: 63-72.

- 61) Lindsay D, Martin G, Williams I. (1993) Nutrition and reproduction. En: King GJ. *Reproduction in Domesticated Animals*. Amsterdam, Elsevier, pp. 459-491.
- 62) Lozano JM, Lonergan P, Boland MP, O'callaghan D. (2003). Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction* 125: 543-553.
- 63) Lozano JM, Abecia JA, Forcada F, Zarazaga L, and Alfaro B (1998). Effect of undernutrition on the distribution of progesterone in the uterus of ewes during the luteal phase of the estrous cycle. *Theriogenology* 49: 539–546.
- 64) McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC (1999). Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol. Rev.* 79: 263–323.
- 65) Meikle A, de Brun V, Carriquiry M, Soca P, Sosa C, Adrien ML, Chilibroste P, Abecia JA (2018) Influences of nutrition and metabolism on reproduction of the female ruminant. *Anim Reprod*; 15(Suppl.1):899-911.
- 66) Meikle A, Tasende C, Sosa C, Garófalo EG (2004). El papel de los receptores de esteroides sexuales en la fisiología reproductiva femenina de las ovejas. *Reprod Fertil Dev.* 16 (4): 385-394.
- 67) Meikle A, Bielli A, Masironi B, Pedrana G, Wang H, Forsberg M, Sahlin L (2000). An immunohistochemical study on the regulation of estrogen receptor alpha by estradiol in the endometrium of the immature ewe. *Reprod. Nutr. Dev.* 40: 587–596.
- 68) Miller BG, Murphy L, Stone GM (1977). Hormone receptor levels and hormone, RNA and protein metabolism in the genital tract during the oestrous cycle of the ewe. *J Endocrinol* 73: 91-98.
- 69) Moor RM, Rowson LE, Hay MF, Caldwell BV (1969). The corpus luteum of the sheep: effect of the conceptus on luteal function at several stages during pregnancy. *J Endocrinol* 43: 301-307.
- 70) Moor RM, Rowson LE (1966a). The corpus luteum of the sheep: effect of the removal of embryos on luteal function. *J Endocrinol* 34, 497-502.
- 71) Moor RM, Rowson LE (1966b). The corpus luteum of the sheep: functional relationship between the embryo and the corpus luteum. *J Endocrinol* 34: 233-239.
- 72) Murray MK, Desouza MM, Messinger SM (1995). Oviduct during early pregnancy: hormonal regulation and interactions with the fertilized ovum. *Microsc Res Tech* 31: 497-506.
- 73) Niswender GD, Nett TM (1994) Corpus luteum and its control in infraprimate species. En: Knobil, E., Neill, J.D. *The Physiology of Reproduction*. New York, Raven, pp. 781- 816.

- 74) O'callaghan D, Boland MP (1999). Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Anim Sci* 68: 299-314.
- 75) Ortega-Domínguez B, Herrera-Ramírez M, Tecalco-Cruz AC. (2015) Receptores nucleares: desde el núcleo hasta el citoplasma. *TIP Rev Esp Cienc Quim Biol.* ; 18 (2): 131-143.
- 76) Pfaffl MW (2009). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
- 77) Pfaffl MW, Georgieva TM, Georgiev IP, Ontsouka E, Hageleit M, Blum JW (2002). Real-time RT-PCR quantification of insulinlike growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. *Domest. Anim. Endocrinol.* 22: 91–102.
- 78) Rhind SM. (1992) Nutrition: its effect on reproductive performance and its control in female sheep and goats. En: Speedy, A.W. *Progress in sheep and goat research.* Wallingford, CAB, pp. 25-52.
- 79) Rhind SM, Mcmillen S, Wetherill GZ, Mckelvey WAC, Gunn RG (1989). Effects of low levels of food intake before and/or after mating on gonadotrophin and progesterone profiles in Greyface ewes. *Anim Prod* 49: 267-273.
- 80) Roberts RM, Cross JC, Leaman DW (1992). Interferons as hormones of pregnancy. *Endocr Rev* 13: 432-452.
- 81) Roberts RM (1989). Conceptus interferons and maternal recognition of pregnancy. *Biol Reprod* 40: 449-452.
- 82) Roche JF, Bolandl MP, Mcgeady TA (1981). Reproductive wastage following artificial insemination of heifers. *Vet Rec.* 109: 401-404.
- 83) Rosenfeld CS, Han CS, Alexenko AP, Spencer TE, Roberts RM (2002). Expression of interferon receptor subunits, IFNAR1 and IFNAR2, in the ovine uterus. *Biol Reprod* , 67 (3): 847-853.
- 84) Rowson LE, Moor RM (1967). The influence of embryonic tissue homogenate infused into the uterus, on the life-span of the corpus luteum in the sheep. *J Reprod Fertil* 13: 511-6.
- 85) Russel AJF, Doney JM, Gunn RG (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *J Agric Sci* 72: 451-454.
- 86) Rutledge RG and Cote C (2003). Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res* 31: e93.

- 87) Schams D, Kohlenberg S, Amselgruber W, Berisha B, Pfaffl MW, Sinowatz F (2003). Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *J. Endocrinol.* 177: 305–317.
- 88) Sequeira M, Pain SJ, de Brun V, Meikle A, Kenyon PR, Blair HT (2015). Gestation-related gene expression and protein localization in endometrial tissue of Suffolk and Cheviot ewes at gestation Day 19, after transfer of Suffolk or Cheviot embryos. *Theriogenology*; 86(6):1557-1565.
- 89) Sheldrick EL, Flick-Smith HC (1993). Effect of ovarian hormones on oxytocin receptor concentrations in explants of uterus from ovariectomized ewes. *J Reprod Fertil* 97: 241-5.
- 90) Short RV (1969) Implantation and the maternal recognition of pregnancy. En: Wolstenholm, G.E.W. y O'connor, M. Ciba Foundation Symposium on Foetal Autonomy. Londres, Churchill Livingstone, pp. 2-26.
- 91) Smith WL, Garavito RM, Dewitt DL (1996). Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 271: 33157-33160.
- 92) Sosa C, Abecia JA, Carriquiry M, Forcada F, Martin GB, Palacin I, and Meikle A (2009a). Early pregnancy alters the metabolic responses to restricted nutrition in sheep. *Domest. Anim. Endocrinol.* 36: 13–23.
- 93) Sosa C, Abecia JA, Carriquiry M, Vázquez MI, Fernández-Foren A, Talmon M, Forcada F y Meikle A (2009b). Efecto de la desnutrición en el ambiente uterino durante el reconocimiento materno del embarazo en ovejas. *Reproducción, fertilidad y desarrollo*, 21 (7): 869-81.
- 94) Sosa C, Abecia JA, Forcada F, Meikle A (2008). Undernutrition reduces the oviductal mRNA expression of progesterone and oestrogen receptors in sheep. *Vet J* 175(3): 413-415.
- 95) Sosa C, Abecia JA, Forcada F, Viñoles C, Tasende C, Valares JA, Palacin I, Martin GB, Meikle A (2006). Effect of undernutrition on uterine progesterone and oestrogen receptors and on endocrine profiles during the ovine oestrous cycle. *Reprod. Fertil. Dev.* 18: 447–458.
- 96) Sosa C, Lozano JM, Viñoles C, Acuña S, Abecia JA, Forcada F, Forsberg M, Meikle A (2004). Effect of plane of nutrition on endometrial sex steroid receptor expression in ewes. *Anim. Reprod. Sci.*84: 337–348.
- 97) Spencer TE, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW (2004a). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci* 82-83: 537-50.
- 98) Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC (2004b). Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction* 128: 657-68.

- 99) Spencer TE, Ott TL, Bazer FW (1998). Expression of interferon regulatory factors one and two in the ovine endometrium: effects of pregnancy and ovine interferon tau. *Biol Reprod* 58: 1154-62.
- 100) Spencer TE, Bazer FW (1996). Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. *Endocrinology* 137: 1144-1147.
- 101) Spencer TE, Bazer FW (1995). Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol Reprod* 53: 1527-1543.
- 102) Stevenson KR, Gilmour RS, Wathes DC (1994a). Localization of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and -II messenger ribonucleic acid and type 1 IGF receptors in the ovine uterus during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology* 134: 1655–1664.
- 103) Stevenson KR, Riley PR, Stewart HJ, Flint AP, Wathes DC (1994b). Localization of oxytocin receptor mRNA in the ovine uterus during the oestrous cycle and early pregnancy. *J. Mol. Endocrinol.* 12, 93–105.
- 104) Taylor KM, Gray CA, Joyce MM, Stewart MD, Bazer FW, Spencer TE (2000). Neonatal ovine uterine development involves alterations in expression of receptors for estrogen, progesterone, and prolactin. *Biol. Reprod.* 63: 1192–1204.
- 105) Thatcher WW, Guzeloglu A, Meikle A, Kamimura S, Bilby T, Kowalski AA, Badinga L, Pershing R, Bartolome J, Santos JE (2003). Regulation of embryo survival in cattle. *Reprod (Suppl 61)*, 253-66.
- 106) Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE (1994). Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr. Rev.* 15: 80–101.
- 107) Viñoles C, Banchero G, Quintans G, Pérez-Clariget R, Soca P, Ungerfeld R, Bielli A, Fernández Abella D, Formoso D, Pereira Machín M, Meikle A (2009). Estado actual de la investigación vinculada a la Producción Animal Limpia, Verde y Ética en Uruguay. *Agrociencia.* 13(3):59-79.
- 108) Viñoles C (2003). Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. Tesis doctoral. Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 56 p.
- 109) Walker SK, Hill JL, Kleemann DO, Nancarrow CD (1996). Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. *Biol Reprod* 55: 703-8.
- 110) Waseem NH, Lane DP (1990). Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J. Cell Sci.* 96: 121–129.

- 111) Wathes DC, Reynolds TS, Robinson RS, Stevenson KR (1998). Role of the insulin-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. *J. Dairy Sci* 81: 1778-89.
- 112) Wathes DC, Lamming GE (1995). The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. *J Reprod Fertil (Suppl 49)*: 53-67.
- 113) Wathes DC, Hamon M (1993). Localization of oestradiol, progesterone and oxytocin receptors in the uterus during the oestrous cycle and early pregnancy of the ewe. *J Endocrinol* 138: 479-491.
- 114) Watson AJ, Westhusin ME, Winger QA (1999). IGF paracrine and autocrine interactions between conceptus and oviduct. *J. Reprod Fertil (Suppl 54)*: 303-15.
- 115) Wintenberger-Torres S, Flechon JE (1974). Ultrastructural evolution of the trophoblast cells of the pre-implantation sheep blastocyst from day 8 to day 18. *J. Anat* 118: 143-53.
- 116) Wu SH, Weber WJ, Chester-Jones H, Hansen LB, and Crooker BA (2004). Effects of intake, selection for milk yield, and bST administration on hepatic expression of insulin receptors and components of the somatotrophic axis in growing Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* 87(Suppl. 1): 364.