

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**SENSIBILIDAD Y CONCENTRACIÓN UTERINA DE PROGESTERONA Y
ESTRADIOL EN OVEJAS SUBNUTRIDAS CON DIFERENTES RESERVAS
CORPORALES DURANTE LA GESTACION TEMPRANA.**

“Por”

Graciana ACHERITEGUY TAGLIABUE y Matilde DUHALDE BENTANCUR

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias.

Orientación: Higiene, Inspección-Control y Tecnología de los alimentos y Producción Animal.

MODALIDAD: Ensayo Experimental.

MONTEVIDEO

URUGUAY

2023

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:



Presidente de mesa:

Dra: Florencia Beracochea



Segundo miembro (Tutor):

Dra. Andrea Fernández Foren



Tercer miembro:

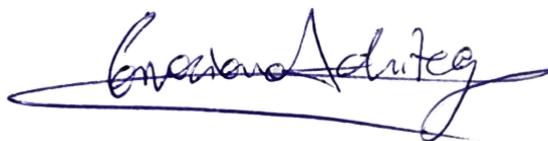
Dra: Graciela Pedrana



Cuarto miembro (co-Tutor):

Dra. Victoria de Brun

Fecha: 22/12/2023



Autoras: Br: Graciana Acheriteguy Tagliabue



Br: Matilde Duhalde Bentancur

AGRADECIMIENTO

A Andrea, tutora y guía durante este proceso, gracias por tu dedicación, apoyo y compromiso. Destacamos tu paciencia, consideración y amabilidad con nosotras.

Tu motivación ha sido de gran ayuda, gracias por compartir esos conocimientos que aportaron a nuestra formación, por esa energía que nos contagiaste durante la elaboración y por sobre todo el cariño y vocación que nos transmitís.

A Victoria, co-tutora quien se comprometió tanto como nosotras con el proyecto. Gracias por tu generosidad y buena disposición en todo momento, fueron junto con Andre un gran apoyo para nosotras.

Sin duda nos fue muy satisfactorio compartir este último tiempo con ustedes.

Graciana

Llegó el momento de dar cierre a esta etapa, que es producto del esfuerzo de muchos años. Dándome la oportunidad de agradecer a aquellos que me acompañaron durante este camino.

A mi madre Susana y a mi abuela Marucha, que fueron un pilar muy importante en mi vida y en este proceso, apoyándome y estando siempre para mí. Hoy no las puedo abrazar, pero seguro que desde algún lugar me acompañan y están feliz como yo de este gran logro. Siempre me acompañan desde el recuerdo. Las amo.

Mi padre Jose, ese hombre que me ha ayudado e impulsado a no bajar los brazos, cuando yo parecía ya no tener fuerzas para continuar. Ejemplo de perseverancia y de quien he aprendido a seguir adelante para lograr mis metas.

Gonza mi compañero desde hace muchos años, mi apoyo incondicional, quien ha sabido acompañarme en este camino. Muchas gracias amor por la contención, la constancia de estar en cada momento que te necesite.

Dori mi pequeño, tu llegada fue muy especial y con ella llenas mi vida de nuevas experiencias. Me brindas energía, la necesaria para continuar con la carrera, hoy me has permitido dedicar tantas horas de estudio, dejando relegados momentos de juegos que ya podremos disfrutar. Te amo.

A mi hermana Maite y mis tías Marisa y Ema, su apoyo ha sido fundamental, siempre han estado para mí y mi familia. El cuidado que le han brindado a Dori, me permitió seguir estudiando.

Yanechu mi hermana de la vida, muchas gracias por estar en todo momento, por siempre tener las palabras justas para poder animarme a seguir y gracias por estar siempre para mí y mi familia.

Mis amigas por el gran apoyo en la vida y a lo largo de esta carrera Verito, Lu R, Valita, Tanita, Juli, Noe M, Lu V y Noe P.

Mis suegros, Claudia y Jorge. Mis cuñados Belu e Ima quienes me apoyan e impulsan a culminar esta etapa, ofreciendo horas de juego y cuidado a Dorito, para que pudiera estudiar.

Matilde

Por mi parte agradecer en especial a mi familia, mamá, papá, a mi hermano Bernardo y a mi incondicional hermana de la vida Maria Noel.

También tíos y mis 2 abuelas.

Me consta han estado todo el tiempo, muchas veces sintiendo los momentos malos y buenos como propios, gracias por el aguante, por SIEMPRE estar, me siento infinitamente afortunada de haber contado con ustedes y de tenerlos.

También a mis amigas, por la contención, las buenas energías, por siempre regalarme de su tiempo, tiempo de calidad y hacer que todo sea MUCHO más fácil.

TABLA DE CONTENIDOS

PAGINA DE APROBACION	2
AGRADECIMIENTOS	3-4
TABLA DE CONTENIDO	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	8-9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9-14
Ciclo estral	9-10
Gestación temprana	10-11
Mecanismo de acción hormonal de estrógenos y progesterona	11
Regulación endócrina sobre la función uterina	12
Estado metabólico, subnutrición y funcionalidad del tracto reproductivo	12-14
Respuestas a la subnutrición acorde al grado de reserva corporal	14
HIPOTESIS	15
OBJETIVOS	15
Objetivos generales	15
Objetivos específicos	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16-19
Animales y tratamientos	16-17
Determinaciones analíticas	18
Determinación de progesterona y estradiol en plasma y en útero	18
Abundancia y localización tisular de proteínas	18-19
Análisis estadístico	19
RESULTADOS	20-23
Peso vivo	20
Tasa ovulatoria, calidad embrionaria y concentración de hormonas sexuales en plasma y útero	21
Localización y abundancia de receptores de estrógenos y progesterona	22-23
DISCUSIÓN	24-26

CONCLUSIONES	27
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	27-34

RESUMEN

La nutrición es uno de los factores más importantes que afectan el ciclo reproductivo de los rumiantes, por lo que es clave cubrir los requerimientos de los animales a los efectos de optimizar su rendimiento productivo (Martin y col., 2004). El objetivo de esta tesis fue estudiar el efecto de la restricción nutricional sobre la calidad embrionaria, la sensibilidad uterina a la progesterona y al estradiol y la concentración de estas hormonas esteroideas en ovejas con diferente grado de reservas corporales iniciales (CCi) durante la gestación temprana. Treinta y seis ovejas Rasa Aragonesa se dividieron en 2 grupos con diferentes CC: CC>2,75 (alto, A, n = 19) y CC<2,25 (bajo, B, n = 17) y se asignaron al azar a dos tratamientos nutricionales: 1,5 (control, C) o 0,5 (subnutridas, S) veces los requerimientos de mantenimiento diario. Al día 5 de gestación se recuperaron los embriones y sólo las ovejas gestantes permanecieron en el experimento, estableciendo cuatro grupos: alta-CCi control (AC, n = 6), alta-CCi subnutridas (AS, n = 7), baja-CCi control (BC, n = 9) y baja-CCi subnutridas (BS, n = 7). Se determinó la tasa ovulatoria, el número de embriones recuperados, la tasa de viabilidad embrionaria. Se determinó progesterona en plasma y estrógeno y progesterona en útero se hizo por radioinmunoanálisis. A su vez a través de inmunohistoquímica se determinó receptor de progesterona y receptor de estrógeno en útero.

Hubo una mayor proporción de ovejas de alta-CCi que presentaron más de un cuerpo lúteo en comparación con las de baja-CCi ($P<0,05$). Asociado a este resultado, las ovejas de alta-CCi también presentaron una mayor concentración plasmática de progesterona ($P<0,05$), mayor número de embriones recuperados ($P<0,05$) y una tendencia a mayor tasa de viabilidad embrionaria ($P=0,13$). En el útero, las ovejas subnutridas tendieron a presentar menor concentración de progesterona ($P=0,09$) y mayor concentración de estradiol ($P=0,10$). La inmunotinción de los receptores de progesterona (PR) y estrógenos (ER) uterinos no se vio afectada por la CCi ni por el tratamiento nutricional. Estos resultados nos permiten sugerir que los efectos negativos causados por una restricción alimenticia sobre la reproducción, serán menos marcados en animales que tienen una buena condición corporal inicial.

SUMMARY

The aim of this thesis was to study the effect of nutritional restriction on embryo quality, uterine progesterone and estradiol sensitivity, and the concentration of these steroid hormones in ewes with different initial body reserves (iBCS) during early gestation. Thirty-six Rasa Aragonesa ewes were divided into 2 groups with different iBCS: iBCS>2.75 (high, A, n = 19) and iBCS<2.25 (low, B, n = 17) and were randomly assigned to two nutritional treatments: 1.5 (control, C) or 0.5 (undernourished, S) times daily maintenance requirements. On day 5 of gestation, the embryos were recovered and only the pregnant ewes remained in the experiment, establishing four groups: high-iBCS control (HC, n = 6), high-iBCS undernourished (HU, n = 7), low-iBCS control (LC, n = 9) and low-iBCS undernourished (LU, n = 7). A greater proportion of high-iBCS ewes presented more than one corpus luteum compared to low-iBCS ewes ($P<0.05$). Associated with this result, high-iBCS ewes also presented higher progesterone plasma concentration ($P<0.05$), a greater number of recovered embryos ($P<0.05$) and a trend towards a higher embryo viability rate ($P=0.13$). Undernourished ewes tended to present a lower uterine progesterone concentration ($P=0.09$) and a higher uterine estradiol concentration ($P=0.10$). Uterine progesterone (PR) and estrogen (ER) receptor immunostaining was not affected by iBCS or nutritional treatment. These results allow us to suggest that the negative effects caused by a dietary restriction on reproduction will be less marked in animals that have a good initial body condition score.

1. INTRODUCCIÓN

La nutrición es uno de los factores más importantes que afectan el ciclo reproductivo de los rumiantes, por lo que es clave cubrir los requerimientos de los animales a los efectos de optimizar su rendimiento productivo (Martin et al., 2004). En este sentido, la subnutrición (la alimentación por debajo de los requerimientos para el mantenimiento del peso vivo) se presenta como un problema en los rebaños comerciales, principalmente en lugares donde la alimentación se basa en el pastoreo. En países de clima templado, donde los animales pastorean pastos naturales durante todo el año, las variaciones estacionales en la cantidad y calidad de los pastos modifican las ganancias de peso a lo largo del año, lo que se ha asociado a la eficiencia reproductiva global (Viñoles et al., 2009). Los efectos de la nutrición sobre las variables reproductivas pueden ser “agudos” cuando no están reflejados por cambios en el peso vivo (PV) o la condición corporal (CC); “estáticos” cuando reflejan diferencias mantenidas en el PV o la CC debido a la historia nutricional o fisiológica de las semanas/meses previos, o “dinámicos” cuando obedecen a cambios de PV o CC en períodos más cortos (días/semanas) (Chilliard, Bocquier y Doreau, 1998; Scaramuzzi et al., 2006).

Abecia et al., (2013) han demostrado que una dieta que proporciona la mitad de los requerimientos nutricionales diarios de mantenimiento produce una disminución significativa de la performance reproductiva: la cantidad de embriones recuperados los días 8 y 9 de gestación fue similar en ovejas subnutridas y controles, pero encontraron diferentes tasas de gestación los días 14 y 15 (Abecia, Rhind, Bramley y McMillen, 1995; Abecia, Lozano, Forcada y Zarazaga, 1997; Abecia, Lozano y Forcada, 1999). Además, los embriones recuperados de las ovejas subnutridas presentaban retraso en el desarrollo con respecto a los de las ovejas bien alimentadas. Las hormonas esteroideas, progesterona (P4) y estradiol (E2), modulan la función del tracto reproductivo y estimulan la secreción de otras sustancias que afectan directamente el ambiente donde se desarrolla el embrión (Buhi, Alvarez y Kouba., 1997; Geisert, Morgan, Short y Jr. Zavy, 1992). 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 embrión. El hallazgo de que las ovejas subnutridas tienen una menor sensibilidad a los esteroides ováricos el día 5 del ciclo estral (Sosa et al., 2004; Sosa et al., 2006; Sosa, Abecia, Forcada y Meikle, 2008), 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, ya que un ambiente materno alterado puede no afectar al embrión inmediatamente, pero sí comprometer su desarrollo en etapas posteriores (Leese, 2005).

En estudios previos, nuestro grupo (Sosa et al., 2006; Sosa et al., 2009) ha encontrado respuestas endocrino-metabólicas diferenciales frente a una misma restricción alimenticia; Estos experimentos, se realizaron con animales de la misma raza, pero con una condición corporal de partida diferente (0.6 puntos de diferencia en una escala de 0 a 5; Russel, Doney y Gunn, 1969). Sin embargo, debido a que estos experimentos

no fueron realizados de forma simultánea, no se pudo determinar la relevancia de las reservas corporales sobre la respuesta endocrino-metabólica cuando los animales se sometían a una restricción nutricional. En este sentido, realizamos otro experimento y pudimos demostrar que la condición corporal afecta los perfiles hormonales y metabólicos luego de una restricción alimenticia en ovinos (Fernández-Foren et al., 2011). Dado que los cambios en el estado metabólico son un regulador importante de la actividad reproductiva, pudiendo actuar a diferentes niveles del eje reproductivo, y de que una nutrición inadecuada puede tener efectos deletéreos importantes en la reproducción (O'Callaghan y Boland, 1999), es que con esta tesis nos propusimos estudiar la funcionalidad uterina durante la gestación temprana en ovejas con diferentes reservas corporales iniciales sometidas a una restricción alimenticia.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ciclo estral

Las ovejas se clasifican como poliéstricas estacionales, presentando varios ciclos estrales durante la temporada reproductiva (Ungerfeld, 2020). El ciclo estral en las ovejas tiene una duración promedio de 17 días, y se define como el tiempo que transcurre entre dos estros (celos) consecutivos (Senger, 2005). El mismo puede dividirse en dos fases: la fase folicular con predominancia hormonal de estrógenos, comprendida por el proestro y el estro, y con una duración aproximada de 4 días; y una fase luteal con predominancia de P4, de 12-13 días de duración, que incluye el metaestro y el diestro (Noakes, Parkinson y England, 2001; Senger, 2005; Ungerfeld, 2002). Estos ciclos son el resultado de la acción conjunta de 4 órganos (hipotálamo, hipófisis, ovarios y útero) y de la comunicación de estos a través de señales hormonales que regulan el ciclo estral, y que conforman el llamado eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Ungerfeld, 2011). El hipotálamo mediante la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) estimula la liberación por parte de la hipófisis de la hormona luteinizante (LH), que da lugar a la formación de un folículo pre-ovulatorio productor de E2. En este punto se genera una retroalimentación positiva entre el E2 y la GnRH, aumentando en consecuencia la frecuencia de pulsos de secreción de GnRH y de LH, hasta llegar al pico preovulatorio de ambas hormonas, desencadenando así la ovulación. Esto que determina el final del celo y la formación del cuerpo lúteo (CL), encargado de mantener los niveles de progesterona (P4) elevados durante la fase luteal. Los niveles de estrógenos durante la fase lútea permanecen bajos, pero ocurren ligeros incrementos que son producto de la formación de nuevos folículos dominantes de las sucesivas ondas de crecimiento folicular que termina con la formación de un nuevo folículo preovulatorio (Quintela, Diaz, Herradón, Peña y Becerra, 2006). El predominio de la P4 hace que, al cabo de esa fase, si el óvulo no es fecundado se produzca un mecanismo de retroalimentación positiva, donde la oxitocina hipofisiaria y luteal favorecen el aumento de la secreción de prostaglandina F2 α (PGF2 α) en forma de pulsos por parte del endometrio uterino, causando la luteólisis (regresión del CL) en los días 14 a 16 del ciclo estral, y en consecuencia la

caída de las concentraciones de P4. En este momento comienza nuevamente el predominio estrogénico por 2 a 3 días. De dicha manera es que la oveja retorna al celo (estro) y completa su ciclo sexual de 17 días (Goodman, 1994). Si tras la ovulación se produce la fecundación, el embrión anuncia su presencia en el tracto reproductivo materno (reconocimiento materno de la gestación, alrededor del día 14 en ovinos) mediante señales moleculares como la secreción de interferón tau (IFN-t). Las señales moleculares, inhiben la liberación pulsátil de PGF2 α a través de la disminución de la expresión de los receptores de oxitocina, evitando de esta manera la luteólisis, garantizando entonces la secreción de P4 por el CL, y, por tanto, promoviendo el desarrollo embrionario (Spencer, Johnson, Bazer y Burghardt, 2004).

2.2 Gestación temprana

La gestación es el proceso fisiológico caracterizado por una serie de cambios físicos, metabólicos y hormonales en la hembra, que culmina con el nacimiento de un nuevo individuo (García Sacristán et al., 1998). Puede ser dividida en dos grandes etapas de desarrollo, la embrionaria (desde la fecundación hasta los 35 días) y la fetal (desde el día 36 hasta el parto) (Fernández Abella, 1993). En la etapa embrionaria, la gestación temprana hace referencia al período que involucra desde la fecundación hasta la implantación, y es una etapa determinante para la supervivencia del embrión (Watson, Westhusin y Winger, 1999), reportándose que entre un 25 y un 55 % de todos los embriones mamíferos se pierden en este período (Goff, 2002; Niswender y Nett, 1994; Roche, Bolandl y Mcgeady, 1981).

El normal desarrollo de los embriones previo a la implantación puede ser dividido en dos fases: temprana y tardía. Cada una de las fases corresponde al tiempo en que están alojados en oviducto y útero, respectivamente (Leese, 1995). Luego de la fecundación el embrión presenta sus primeras divisiones celulares en el oviducto y entra al cuerno uterino alrededor del día 4 post-celo en el estado de mórula compacta. Hacia el día 6, las células se compactan y por entrada del líquido extracelular se forma una cavidad rodeada por células trofoblásticas, constituyendo el estadio de blastocisto. Posteriormente, el blastocisto se expande y eclosiona entre los días 8 y 9 (Spencer et al., 2004). Hacia el día 11 va adoptando una forma tubular y luego se elonga convirtiéndose en un embrión filamentosos entre los días 12 y 16 (Wintenberger-Torres y Flechon, 1974). La elongación del blastocisto marca el comienzo de la implantación, aunque la adhesión firme al endometrio no ocurre hasta el día 16 (Wintenberger-Torres y Flechon, 1974). Hasta la implantación, el embrión se desarrolla libremente en el oviducto y en el útero y es dependiente de sus secreciones (Ashworth, 1995; Fleming et al., 2004; Spencer et al., 2004). Durante este período hay complejas interacciones entre el embrión, los ovarios y el endometrio que son necesarias para el correcto desarrollo y establecimiento de la preñez (Goff, 2002). El embrión requiere de factores que se originan en el tracto reproductivo bajo la influencia de la P4 y los estrógenos (E), los cuales actúan de manera parácrina y/o autócrina, regulando su crecimiento (Paria y Dey, 1990; Stewart y Cullinan, 1997). En este sentido, Graña et al. (2020) reportan que el ambiente materno a tan solo 6 días de la

ovulación responde a la influencia local del CL, observando la mayor proporción de embriones viables y el mejor desarrollo embrionario en el oviducto/cuerno uterino ipsilateral al CL, asociado a una mayor concentración de P4 y otros factores en el cuerno uterino ipsilateral.

2.3 Mecanismo de acción hormonal de estrógenos y progesterona

Las hormonas son sustancias orgánicas secretadas por glándulas o tejidos especializados, cuya función es la regulación de procesos fisiológicos y el mantenimiento de la homeostasis (Barrington 2019). A pesar de que las hormonas llegan a todos los tejidos, sólo algunos tienen la capacidad de responder a ellas. Los tejidos que responden a la acción de las hormonas se denominan tejidos diana y se debe a la presencia de receptores específicos que se unen con alta afinidad a la hormona. La respuesta celular a la hormona (o sensibilidad) está dada en parte por la concentración de estos receptores presentes en el tejido (Katzenellenbogen, 1980). La unión de la hormona a su receptor inducirá una respuesta biológica en los tejidos sensibles, modificando el comportamiento de la célula diana. La estructura química de las hormonas determina el tipo de síntesis, almacenamiento, secreción, transporte y mecanismo de acción dentro de las células (Shupnik, 1997). Según esta estructura química, las hormonas pueden ser clasificadas en tres grupos: 1) hormonas peptídicas y/o proteicas, 2) hormonas derivadas de aminoácidos y 3) hormonas lipídicas, dentro de las cuales se encuentran los esteroides sexuales.

Las hormonas esteroideas (P4 y E) se sintetizan a partir de la molécula hidrófoba no polar, el colesterol (Gimpl, Wiegand, Burger y Fahrenholz, 2002). Estas hormonas son poco solubles en agua, por lo que circulan unidas de forma reversible a proteínas transportadoras que ayudan en su transporte y distribución a las células diana en el medio acuoso del líquido extracelular. Debido a su naturaleza lipídica y a su bajo peso molecular, atraviesan fácilmente la membrana celular entrando a las células por difusión, allí se unen a receptores específicos de localización nuclear (receptor de progesterona -PR- y receptor de estrógeno -ER-). La unión de la hormona a su receptor conlleva cambios de conformación que convierten al complejo hormona-receptor inactivo en activo (lo cual implica su dimerización), y posibilita la unión a sitios específicos en el ADN, activando genes y estimulando su transcripción para producir ARN mensajeros (ARNm). Los ARNm son traducidos en los ribosomas citoplásmicos produciendo proteínas que influyen en la función celular. Una vez que el complejo hormona-receptor interactuó con un gen, el receptor sufre reacciones que resultan en su reciclaje o destrucción (Clark y Mani, 1994). Existen dos tipos de ER producto de dos genes diferentes; el ER α es el receptor clásico y predominante en el tracto reproductivo (Meikle, Tasende, Sosa y Garofalo, 2004), y el ER β reportado en el endometrio (Hapangama, Kamal y Bulmer., 2015). Ambos receptores presentan una alta homología en sus ERE (elementos de respuesta a esteroides) 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 PR han sido descritas en ratas: A y B (Conneely, Mulac-Jericevic, Lyndon y Mayo, 2001). Los PR-A y PR-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.

2.4 Regulación endócrina sobre la función uterina

El endometrio sufre una serie de transformaciones cíclicas en respuesta a la fluctuación de los niveles sanguíneos de las hormonas ováricas (Fawcett, 1988; Hafez, 1996). Los E promueven la proliferación celular en el endometrio (Comer, Leese y Southgate, 1998; Murray, 1992; Murry, 1997), provocando un rápido aumento en el número de células epiteliales sensibles a los esteroides y preparan el epitelio uterino y el estroma para la acción de la P4 (Niswender y Nett, 1994; Maslar, 1988). La P4 actúa en el útero asegurando su quiescencia, estimulando y manteniendo las funciones secretoras endometriales esenciales para el desarrollo temprano del embrión, implantación, placentación y un correcto desarrollo feto-placentario hasta el término de la gestación (Graham y Clarke, 1997). Una porción considerable de las pérdidas embrionarias es atribuida a una circulación inadecuada de la concentración de P4 o a la baja expresión génica de sus receptores en el endometrio (Lonergan, 2011). En este sentido, las bajas concentraciones de P4 están implicadas en menores tasas de preñez (Diskin y Morris, 2008). Sin embargo las altas concentraciones de P4 circulante en el período de post-concepción se asocian a un desarrollo avanzado en la elongación del concepto (Garrett, Geisert, Zavy y Morgan, 1988; Carter et al, 2008; Satterfield, Bazer y Spencer, 2006), en un incremento de la producción del interferón tau (Mann y Lamming, 1999; Mann y Lamming, 2001) y en mayores tasas de preñez en los ovinos (Ashworth, Sales y Wilmut, 1989; McNeill y col., 2006; Stronge et al, 2005). Asimismo, el tejido secretor epitelial del oviducto y del útero se diferencian en respuesta al E2 y a la P4, modificando las concentraciones de ciertas proteínas en estos tejidos (Gray et al, 2001; Murray y Sower 1992; Murray 1995; Yániz, Lopez-Gatius, Santolaria y Mullins, 2000).

2.5 Estado metabólico, subnutrición y funcionalidad del tracto reproductivo

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 (energía almacenada en los tejidos corporales, especialmente el tejido adiposo, el cual es un sistema de almacenamiento altamente eficiente) y del ritmo de utilización de la energía (Blache, Zhang y Martin, 2006; Renaville, Hammadi y Portetelle, 2002). La cantidad de energía gastada varía acorde a la edad y al estado fisiológico del animal y comprende la energía utilizada en funciones que son fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis y la energía utilizada en necesidades fisiológicas adicionales, tales como el crecimiento y la reproducción (Blache et al., 2006). Una

forma de conocer el estado de las reservas corporales de un animal es a través de la evaluación del peso vivo (PV) y de la condición corporal (CC). El PV incluye el peso de los tejidos corporales y el contenido del tracto digestivo (intestino lleno) y vejiga (Irigoyen, 2005). La CC es una medida subjetiva del estado nutricional del animal y se basa en la determinación del estado de las reservas energética del animal (Russel, 1984). Actualmente la escala más utilizada es la de 5 puntos propuesta por Russel et al. (1969), donde 1 representa a un animal emaciado y 5 a un animal obeso. La técnica consta en palpar los procesos espinosos y transversos de las vértebras lumbares evaluando la cobertura grasa y muscular (Jefferies, 1961). Si bien la composición corporal varía según la raza, la edad y el estado fisiológico, cuando los animales están bajo las mismas condiciones, el uso del PV y la CC para evaluar el estado de reservas corporales es muy conveniente.

Los cambios en el estado metabólico (por ejemplo, subnutrición y sobrealimentación) regulan de forma importante la actividad reproductiva, actuando a diferentes niveles en el eje reproductivo (hipotálamo, hipófisis, gónadas y tracto reproductivo). En ovinos se ha reportado una fuerte correlación negativa entre los niveles plasmáticos de progesterona periférica y el nivel de alimentación (Parr, Davis, Fairclough y Miles, 1987; Parr, Davis, Miles y Squires, 1993; Rhind, Martin, McMillen, Tsonis y McNeilly, 1989a), siendo los animales subnutridos los que presentaban las mayores concentraciones plasmáticas de P4 en comparación con los alimentados con una dieta que cubría los requerimientos de mantenimiento. Sin embargo, estas mayores concentraciones plasmáticas de P4 observadas en animales subnutridos respecto a los controles no se explicarían por una mayor síntesis de progesterona, ya que la producción in vitro por el CL no se ha visto afectada por la subnutrición (Abecia et al., 1995; Abecia et al., 1997; Abecia et al., 1999; Parr, 1992) propuso que este fenómeno se debía a una mayor metabolización hepática de la hormona en animales controles, más que a cambios en la tasa de secreción por el CL, dado que las ovejas mejor nutridas presentaban hígados más pesados y un mayor flujo sanguíneo en la vena porta. Además, los esteroides se almacenan selectivamente en el tejido adiposo, por lo que se ha sugerido que un régimen de alimentación que resulte en la lipólisis (restricción nutricional) llevará aparejado una liberación del esteroide almacenado (Boland, Lonergan y O'Callaghan, 2001). Estos mayores niveles plasmáticos de P4 en animales subnutridos parecerían contrastar con las menores tasas de preñez asociadas a la subnutrición (Abecia, Sosa, Forcada y Meikle, 2006). La relación errática entre el nivel nutricional, las concentraciones plasmáticas de P4 y la supervivencia embrionaria, sugirieron que quizá la medición de P4 circulante no era buen reflejo de la situación en el tracto reproductivo, y que deberían medirse las concentraciones de la hormona a nivel local (Rhind, McMillen, Wetherill, Mckelvey y Gunn, 1989c. En este sentido, Lozano, Abecia, Forcada, Zarazaga y Alfaro, 1998; Sosa et al., 2006) reportaron que ovejas subnutridas presentaban concentraciones endometriales de P4 menores respecto a las ovejas controles, lo que podría comprometer el desarrollo embrionario temprano en los animales subnutridos. Sumado a esto, se ha demostrado, además, que las ovejas subnutridas presentan una sensibilidad reducida a los esteroides el día 5 del ciclo sexual: menor contenido endometrial de PR (Sosa et al., 2004) y ER α (Sosa et al., 2006), menor capacidad de unión de PR y ER endometriales (Sosa et al., 2006) y menor expresión génica de PR

y $ER\alpha$ en el oviducto ipsilateral al CL (Sosa et al., 2008). Estos hallazgos podrían traducirse en un inadecuado sustento de las necesidades de un embrión en crecimiento, pudiendo explicar el aumento de la mortalidad embrionaria asociada a la subnutrición. En estos mismos trabajos no se encontraron diferencias en la expresión o inmunotinción de PR y ER 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 más tardío y las consecuentes pérdidas de preñez.

2.6 Respuestas a la subnutrición acorde al grado de reserva corporal

Las respuestas metabólicas a los cambios en el estado metabólico pueden depender de la historia metabólica reciente (nivel de alimentación, efecto dinámico) o más antigua (reservas corporales, efecto estático), concepto denominado memoria metabólica (Blache et al., 2006; Chilliard, Delavaud y Bonnet, 2005; Zhang, Dominique Blache y Blackberry Graeme, 2005). Se ha sugerido que el impacto de una restricción alimenticia varía de acuerdo con el estado fisiológico y la condición corporal del animal (Blanc, Bocquier, Agabriel, D'Hour y Chilliard, 2006). En este sentido, en experimentos realizados por nuestro grupo (Sosa et al., 2006; Sosa et al., 2009), en los que se sometió a ovejas adultas de la misma raza al mismo período y nivel de subnutrición (mitad de requerimientos de mantenimiento), las respuestas endócrino-metabólicas a la restricción alimenticia fueron diferentes. Si bien los porcentajes de pérdida de PV y CC fueron similares, la variación de PV y CC que hubo entre el experimento del 2006 y 2009 fue de un 10%, por lo tanto, postulamos que estas respuestas diferenciales al mismo tratamiento subnutricional podrían deberse al grado de reservas corporales iniciales.

Si bien la información disponible respecto a la subnutrición y su efecto sobre la reproducción es muy estudiada y ha sido ampliamente reportada (Abecia et al., 1995; Abecia et al., 1997; Abecia et al., 1999; Brien, Cumming, Clarke y Cocks., 1981; Lozano, Lonergan, Boland y O'callaghan, 2003; Rhind et al., 1989a.), no hemos encontrado trabajos que estudien el efecto de la restricción alimentaria en ovejas con diferentes reservas corporales iniciales sobre la funcionalidad uterina al momento en el cual el embrión llega al útero (día 5) y es totalmente dependiente del ambiente materno. En este sentido, es de gran relevancia comprender como la diferencia en las reservas corporales ("memoria metabólica") de los animales influye en el ambiente uterino (concentración de esteroides en el útero y la sensibilidad tisular a los mismos) cuando estos están sometidos a una restricción alimenticia.

3. HIPÓTESIS

La subnutrición impacta de manera diferencial sobre la calidad embrionaria, la sensibilidad y la concentración de P4 y E2 en ovejas con diferentes reservas corporales durante la gestación temprana

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos generales

Determinar el efecto de la restricción nutricional sobre la calidad embrionaria, la sensibilidad uterina a la P4 y al E2 y la concentración de estas hormonas esteroideas en ovejas con diferente grado de reservas corporales durante la gestación temprana.

4.2 Objetivos específicos

Determinar

- el peso vivo de los animales,
- la tasa ovulatoria
- la calidad embrionaria en términos de número de embriones recuperados
- tasa de viabilidad embrionaria
- las concentraciones de P4 en plasma
- las concentraciones de P4 y E2 en útero
- la inmunolocalización y abundancia de RP y de ER α endometriales

en ovejas con diferente grado de reservas corporales y que fueron sometidas a una restricción alimenticia durante la gestación temprana.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales y tratamientos

El experimento se llevó a cabo en la granja experimental de la Universidad de Zaragoza, España, 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.

Se realizó durante la estación reproductiva, utilizando 36 ovejas adultas Rasa Aragonesa. Las mismas fueron adjudicadas a 2 grupos con diferente CC (CC inicial, CCI) (CC, escala de 1 a 5; Russel y col., 1969): CCI > 2,75 (n=19, moderadamente alta, (A) y CCI < 2,25 (n=17, moderadamente baja, (B), Figura 1). El PV al inicio del experimento fue de $61,9 \pm 1,6$ kg y $50,9 \pm 1,7$ kg para el grupo A y B, respectivamente; y la CCI fue de $2,9 \pm 0,04$ para el grupo A y $2,1 \pm 0,04$ para el B. Durante 20 días, ambos grupos recibieron una dieta para cubrir los requerimientos de mantenimiento en energía y proteína (AFRC, 1993). Las dietas consistieron en: 0,45 kg de materia fresca (MF) de concentrado (pienso) y 0,55 kg MF de paja/oveja/día para el Grupo A, y en 0,40 kg MF de concentrado y 0,50 kg MF de paja/oveja/día para el Grupo B. Ambas dietas proporcionaron 2 Mcal EM/kg MF y 9% de proteína bruta PB. El concentrado estaba compuesto por cebada y soja, en una relación porcentual de 85:15. Tras este período, cada grupo se dividió en 2 subgrupos para proporcionar 1,5 (control, C) o 0,5 (subnutrición, S) veces los requerimientos diarios de mantenimiento durante 20 días (basado en a nuestros trabajos previos :Abecia, Forcada, Zarazaga y Lozano, 1993; Abecia et al., 1995; Lozano et al., 1998; Sosa et al., 2006) hasta el sacrificio (Figura 1). Las dietas consistieron en 0,60 kg (MF) de pienso y 0,9 kg MF de paja/oveja/día para la dieta 1,5M (grupo C) y 0,20 kg MF de pienso y 0,30 kg MF de paja/oveja/día para la dieta 0,5 M (grupo S). Ambas dietas proporcionaron 2.1Mcal EM/kg MF y 11% de PB. El concentrado estaba compuesto por cebada y soja en una relación de 66:34 y el consumo fue realizado de manera grupal. Por lo tanto, los 4 grupos experimentales fueron: ovejas de alta-CCI control (AC), ovejas de alta-CCI subnutridas (AS), ovejas de baja-CCI control (BC) y ovejas de baja-CCI subnutridas (BS). Al comienzo del tratamiento con las diferentes dietas, todas las ovejas fueron sincronizadas con esponjas intravaginales impregnadas de progestágeno (acetato de fluorogestona, 40 mg; ISPAH, Salamanca, España) durante 14 días. Al momento de la retirada de las esponjas, las ovejas fueron inyectadas i.m. con 300 UI de gonadotrofina coriónica equina (Sincropart® PMSG, Ceva Salud Animal, Barcelona,

España). El estro (Día 0) se detectó cada 8 horas a partir de las 24 horas de retiradas las esponjas, y las ovejas fueron cubiertas por 10 carneros de la misma raza de fertilidad probada. El día 5 después del celo, los animales de cada grupo fueron sacrificados y se utilizaron para este estudio solo las ovejas preñadas. Los cuernos uterinos fueron lavados con buffer fosfato salino (PBS) y la preñez se definió por la presencia de un embrión. La tasa ovulatoria se determinó cuantificando el número de CL funcionales presentes en los ovarios. Los embriones fueron examinados y clasificados (Winterberger-Torres y Sevellec, 1987). Las mórulas y las mórulas compactas se consideraron embriones viables, según lo esperado para el día 5 de gestación (Winterberger-Torres y Sevellec, 1987). La tasa de viabilidad embrionaria fue definida como número de embriones viables/número de embriones recuperados. Los grupos experimentales finales fueron: AC (n=6), AS (n=7), BC (n=9) y BS (n=7).

El PV fue determinado los días -35, -21, -15 (inserción de esponjas e inicio de dietas diferenciales), -1 (retiro de esponjas) y 5 (sacrificio) con respecto al estro, durante la mañana (antes de ofrecerles la ración) y, por lo tanto, estando los animales en ayuno. Las muestras de sangre se extrajeron cada 3 días en tubos de vacío con heparina de la vena yugular de animales en ayuno, desde el día anterior del comienzo de las dietas diferenciales (día -16) hasta el final del experimento. El plasma fue separado por centrifugación a 1000g por 10 minutos y almacenado a -20°C hasta la posterior determinación de hormonas.

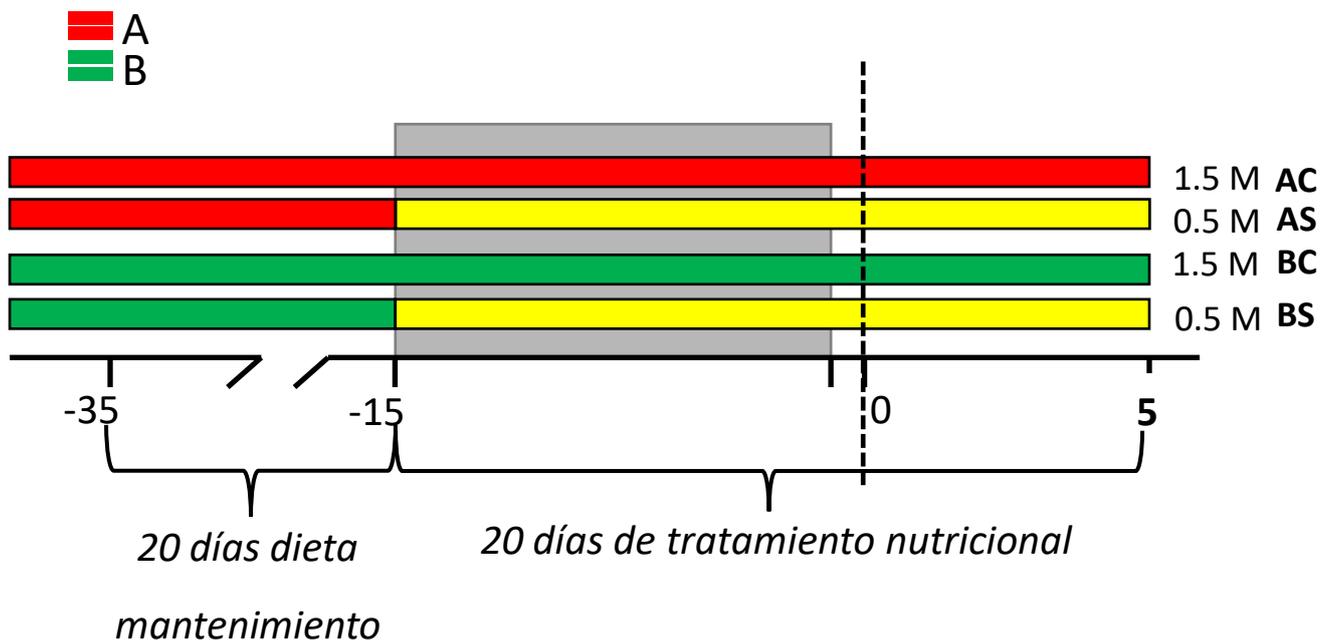


Figura 1. Representación esquemática del diseño experimental. Ovejas con una condición corporal inicial moderadamente alta (A) y moderadamente baja (B) alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimientos de mantenimiento. Los 4 grupos experimentales fueron: ovejas altas control (AC, barra roja), ovejas altas subnutridas (AS, barra roja y amarilla), ovejas bajas control (BC, barra verde) y ovejas bajas subnutridas (BS, barra verde y amarilla). El área sombreada de gris indica el período del tratamiento con progestágenos para la sincronización de celos. La línea punteada indica el día del celo (día 0) previo al sacrificio el día 5.

5.2 Determinaciones analíticas

5.2.1 Determinación de progesterona y estradiol en plasma y en útero

Todas las determinaciones hormonales se realizaron en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal de la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay.

Las concentraciones de P4 fueron determinadas en plasma y en macerados de tejido uterino, y las concentraciones de E2 fueron determinadas en macerados de tejido uterino. Para la determinación hormonal en útero, el tejido se procesó siguiendo la técnica de Abecia et al., (1996). Brevemente, las secciones uterinas (alrededor de 500 mg) se homogeneizaron en 5 mL de PBS (NaCl, KCl, Na₂HPO₄ y KH₂PO₄; 0,01 M, pH 7,5) utilizando un homogeneizador de tejidos, y el sobrenadante se recogió después de una centrifugación a 1000 g durante 10 min. Se realizaron 4 extracciones sucesivas con éter y se resuspendieron en 300 uL de buffer, luego se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento. La concentración de P4 y E2 medidas en útero se expresaron en relación con los gramos de tejido utilizado en la maceración.

Las concentraciones de P4 en plasma y tejido uterino se determinaron mediante un radioinmunoensayo (RIA) en fase sólida utilizando un kit comercial (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Los Angeles, CA). La sensibilidad del ensayo fue de 0,02 ng/mL. Los coeficientes de variación intraensayo para controles bajos (2 ng/mL) y altos (10 ng/mL) fueron 12,5% y 5,7% respectivamente para plasma y tejido uterino. Las concentraciones de E2 fueron determinadas por un RIA en fase líquida utilizando kits de MP (MP BIOMEDICALS, INC. Solon, OH 44139 USA). La concentración mínima detectable del ensayo fue de 1,70 pg/mL. El coeficiente de variación intraensayo para el control bajo (9,6 pg/ml) fue 13.0 %.

5.2.2 Abundancia y localización tisular de proteínas

Al momento del sacrificio, se extrajeron secciones del útero del cuerno uterino ipsilateral al CL, se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 12 hs y sumergidos en concentraciones crecientes de etanol (70 °, 96 ° y 100 °), cloroformo, e incluidos e impregnados en parafina para la confección de bloques. La inmunoreacción de PR y ER α se observó en secciones uterinas transversales de 5 μ m usando la técnica inmunohistoquímica de avidina-biotina-peroxidasa (Meikle et al., 2000). Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-PR monoclonal de ratón (Zymed, South San Francisco, CA, EE. UU.) y anti-ER α monoclonales (Santa Cruz Biotechnology,

Santa Cruz, CA, EE. UU.) diluidos 1:100 y 1:25 en PBS, respectivamente. Se obtuvieron controles negativos para cada receptor reemplazando el anticuerpo primario con una IgG no inmune homóloga en concentraciones equivalentes monoclonales (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.). Después de la unión del anticuerpo primario, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado (IgG anti-ratón de caballo; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.) diluido 1: 200 en suero normal de caballo. Para la visualización de la inmunolocalización se utilizó un kit Vectastain Elite ABC seguido de un sustrato de peroxidasa DAB (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Finalmente, se contrastaron las secciones con hematoxilina. Para cada receptor, todas las muestras se analizaron en el mismo ensayo inmunohistoquímico.

La inmunotinción promedio y la proporción de células positivas se calcularon a partir de la evaluación de diez campos (aumento de 1000X) por tipo celular y por oveja, como se describió anteriormente (Sosa et al., 2004). Ambos receptores se evaluaron en cinco compartimentos endometriales: epitelio luminal (EL), epitelio glandular superficial y profundo (EGs y EGp) y estroma intercaruncular superficial (Es) y profundo (Ep).

5.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos fue realizado con el software SAS (versión 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). La tasa ovulatoria y las variables relacionadas con el embrión se analizaron mediante el procedimiento Proc Genmod, que incluyó en el modelo estadístico la CC inicial, el tratamiento nutricional y su interacción. La proporción de ovejas que ovularon un solo CL o más de uno se analizó mediante chi-cuadrado. La concentración de P4 y E2, y la inmunolocalización de PR y ER α se analizó por ANOVA mediante un procedimiento mixto. El modelo incluyó los efectos fijos de CC inicial (alta o baja), tratamiento nutricional (control o subnutrición), y sus interacciones, y la estructura de covarianza autorregresiva de primer orden. Además de los efectos de la CCi y del tratamiento nutricional, el modelo que estudiaba los datos inmunohistoquímicos también incluyó los efectos fijos del tipo celular (epitelio luminal, epitelio glandular y estroma), la localización (superficial y profunda) y sus interacciones. El procedimiento de Kenward-Rogers se utilizó para ajustar los grados de libertad del denominador. La separación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey. Se utilizaron los coeficientes de correlación de Pearson para describir las relaciones entre las variables. Los datos se presentan como medias de mínimos cuadrados \pm errores estándar. Las diferencias entre las medias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$, y la tendencia cuando $P < 0,10$. Para los datos de embriones, se consideró la tendencia cuando $P < 0,15$ (de Brun y col. 2016).

6. RESULTADOS

6.1 Peso vivo

Desde el comienzo del experimento hasta el día -15 (comienzo del tratamiento nutricional), el PV fue menor en las ovejas de baja CC en comparación con las de alta CC ($50,9 \pm 1,7$ vs $61,9 \pm 1,6$ kg respectivamente; $P < 0,0001$). Desde el día -15 hasta el día 5, las ovejas AS y BS perdieron peso vivo (6 y 7.3 kg, respectivamente; $P < 0,05$), mientras que el grupo BC ganó 5,8 kg ($P < 0,05$) y las ovejas AC mantuvieron su PV (Figura 2).

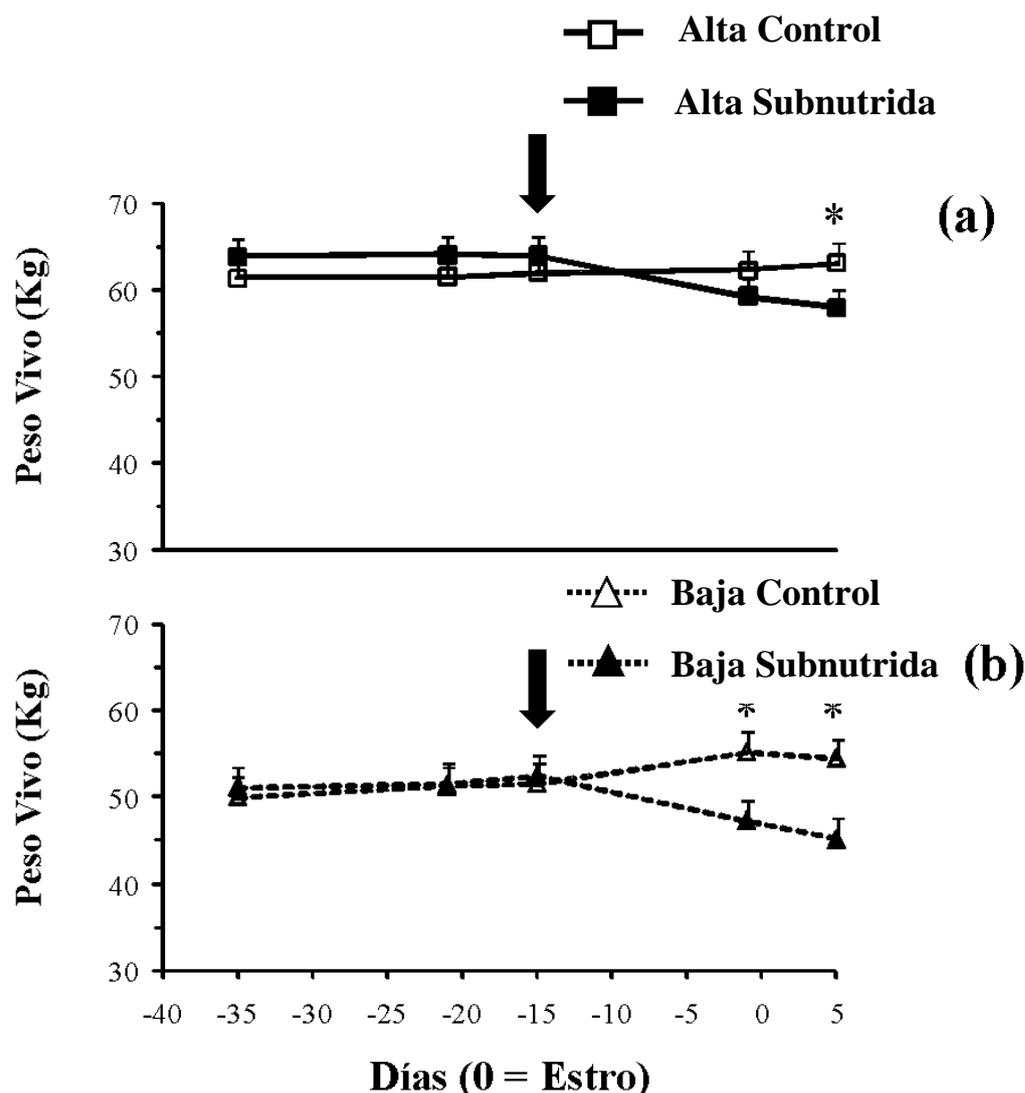


Figura 2. Peso vivo (PV) en ovejas con condición corporal inicial alta (a) y baja (b) alimentadas con 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces los requerimientos de mantenimiento. Las flechas negras indican el inicio de las dietas diferenciales. Los asteriscos indican diferencias entre grupos, $P < 0,05$.

6.2 Tasa ovulatoria, calidad embrionaria y concentración de hormonas sexuales en plasma y útero

Si bien no hubo efecto de la CCi, del tratamiento nutricional o su interacción sobre la tasa ovulatoria ($P > 0,05$, Tabla 1), la proporción de animales con un sólo CL o más de un CL estuvo afectada por la CCi: hubo una mayor proporción de ovejas de alta-CCi que presentaron más de un CL que ovejas de baja-CCi (75 vs 37,5 %, $P < 0,05$).

Como se observa en la Tabla 1, el número de embriones recuperados estuvo afectado por la CCi y el tratamiento nutricional ($P \leq 0,05$), pero la interacción no fue significativa. Se recuperó un mayor número de embriones de ovejas de alta-CCi respecto a ovejas de baja-CCi ($1,6 \pm 0,1$ vs $1,3 \pm 0,1$, $P < 0,05$), y de ovejas controles respecto a ovejas

subnutridas ($1,5 \pm 0,1$ vs $1,3 \pm 0,10$, $P=0,05$). También, la tasa de viabilidad embrionaria tendió a ser mayor en las ovejas de alta-CCi ($83,3 \pm 12,4$ vs $58,3 \pm 10,8\%$, $P=0,13$).

Las ovejas de alta-CCi presentaron mayor concentración plasmática de P4 en comparación con las ovejas de baja-CCi el día 5 de gestación ($3,5 \pm 0,3$ vs $2,2 \pm 0,3$ ng / mL, $P<0,05$), mientras que no hubo efecto del tratamiento nutricional. Sin embargo, en el útero al día 5, no hubo efecto de la CCi sobre la concentración de P4 y E2, pero las ovejas controles tendieron a presentar mayor concentración de P4 ($21,8 \pm 2,5$ vs. $15,4 \pm 2,5$ ng/g de tejido; $P=0,09$) y una menor concentración de E2 en útero ($254,5 \pm 26,9$ vs $318,4 \pm 27,3$ pg / g de tejido; $P=0,10$) que las ovejas subnutridas. El número de CL se correlacionó con la P4 plasmática ($r = 0,58$, $P<0,01$) y con la P4 uterina ($r = 0,40$, $P<0,05$).

Tabla 1. Tasa ovulatoria, recuperación de embriones y tasa de viabilidad embrionaria (%)_en ovejas con alta (A) o baja (B) condición corporal inicial alimentadas con 0.5 (Subnutrido, S) o 1.5 (Control, C) veces los requerimientos de mantenimiento diario, en el día 5 de gestación.

	<u>AC</u>	<u>AS</u>	<u>BC</u>	<u>BS</u>	<u>CCi</u>	<u>I</u>	<u>CCi*T</u>
Tasa ovulatoria	$2,0 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,2$	ns	ns	ns
Recuperación de embriones	$1,8 \pm 0, 2^a$	$1,3 \pm 0,2^b$	$1,3 \pm 0,1^b$	$1,3 \pm 0,2^b$	$P<0,05$	$P=0,05$	ns
Tasa viabilidad embrionaria	$83,3 \pm 17,5$	$83,3 \pm 17,5$	$66,7 \pm 14,3$	$50,0 \pm 16,2$	$P=0,13$	ns	ns

a vs. b, $P<0,05$.

6.3 Localización y abundancia de receptores de estrógenos y progesterona

Tanto PR como ER α se localizaron en los núcleos de las células. El área y la intensidad de la inmunotinción para PR y ER α no se vieron afectadas por la CCi, el tratamiento nutricional y su interacción (Figuras 3 y 4). La expresión de PR varió según el tipo celular y la ubicación (superficial o profunda): la ubicación superficial presentó una mayor intensidad de tinción respecto a la profunda ($P<0,0001$), siendo el EL el tipo celular que presentó la mayor intensidad de tinción, y el EGp el tipo celular que mostró la menor intensidad de tinción. El ER α fue afectado por el tipo celular ($P<0,0001$), siendo el Es endometrial quien presentó la mayor intensidad de tinción y el EL el tipo celular con menor intensidad.

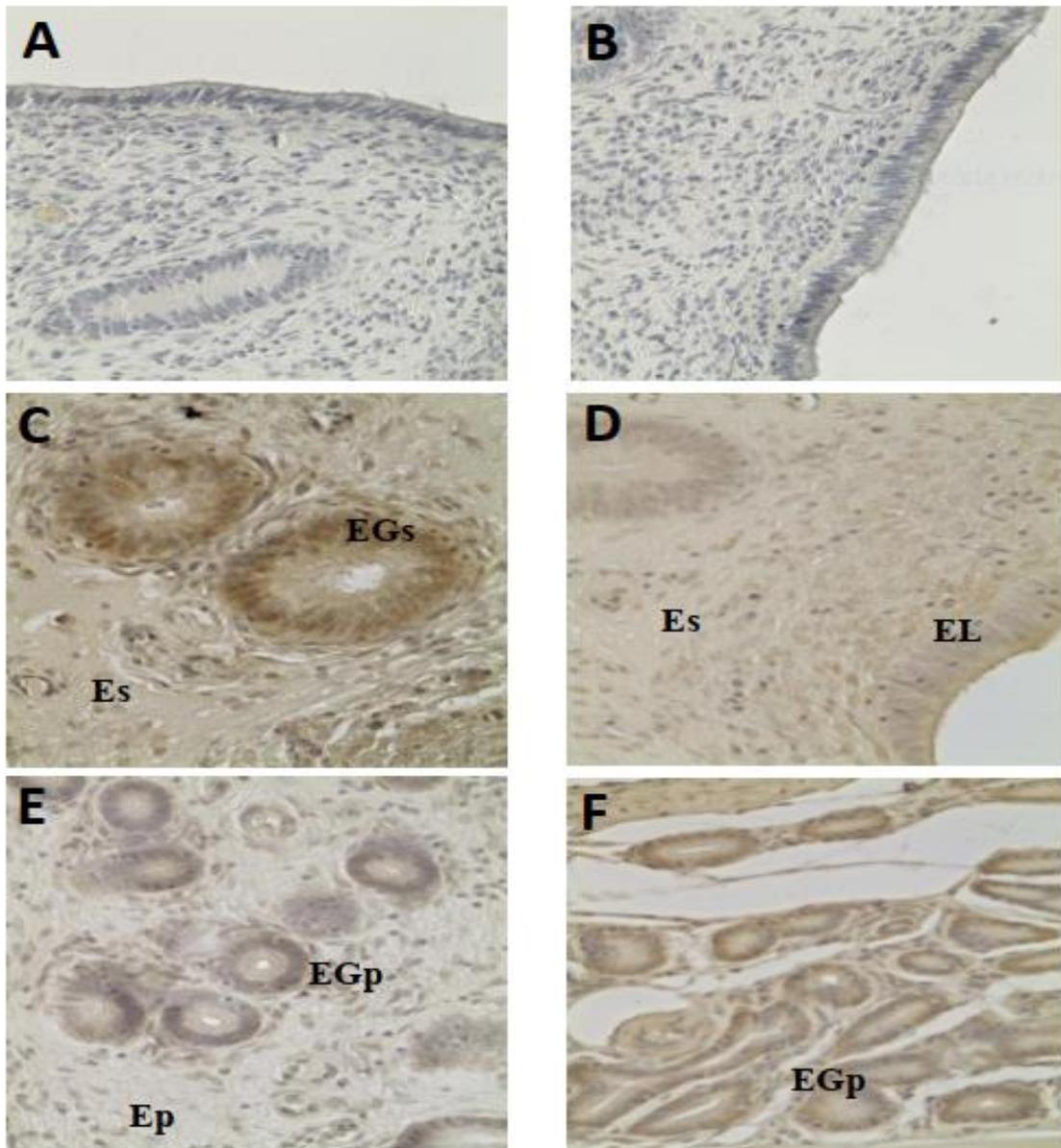


Figura 3. Inmunomarcado de PR (C-E) y ER α (D-F) (Aumento: 400X). EL = epitelio luminal, EGs = epitelio glandular superficial, EGp = EG profundo, Es = estroma superficial, Ep = estroma profundo. Cuando se sustituyeron los anticuerpos específicos, la ausencia de inmunomarcado confirmó la especificidad de la tinción (A-PR y B-ER, Aumento: 400X)

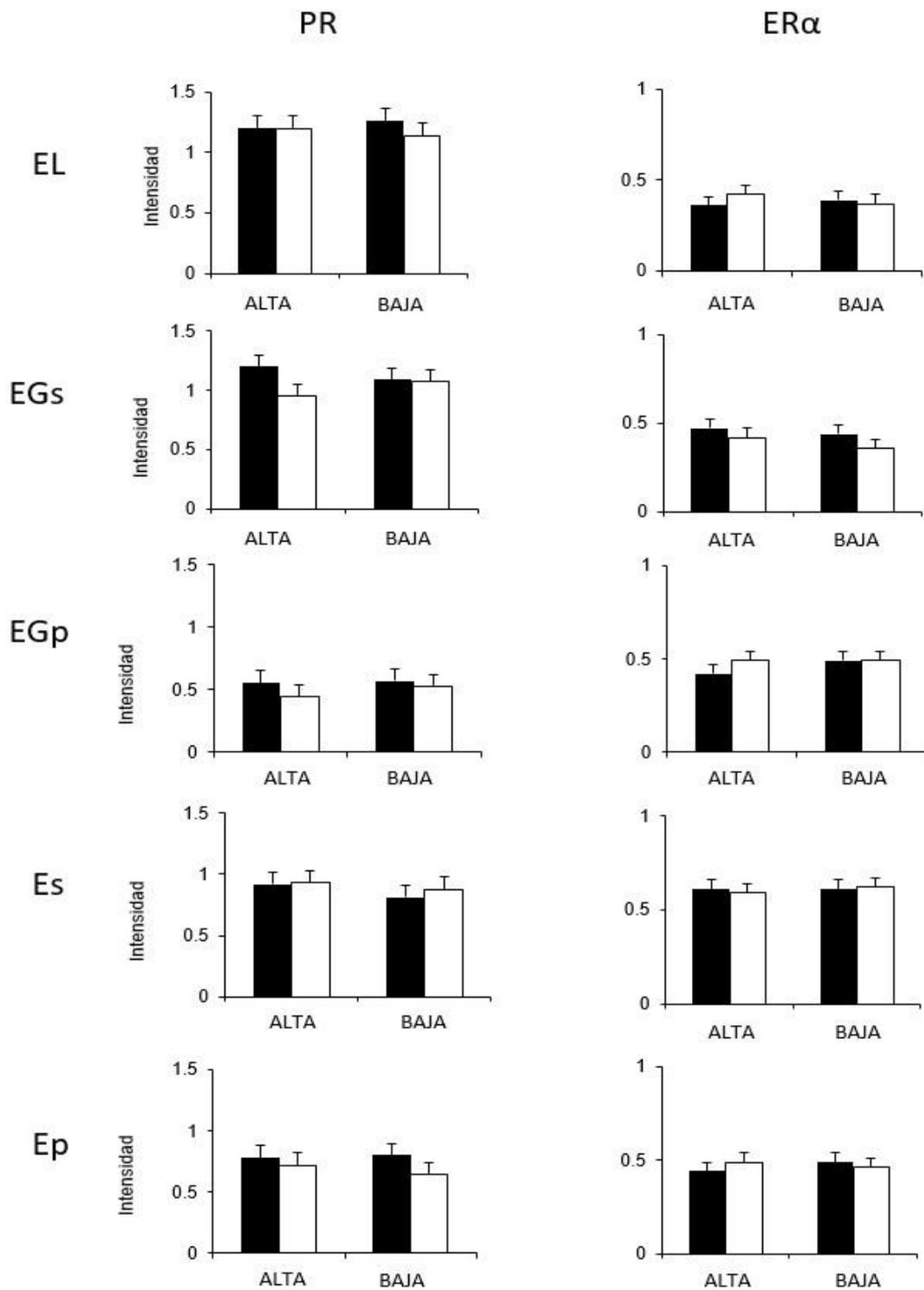


Figura 4. Intensidad de tinción de PR y ERα en el endometrio de ovejas de alta o baja condición corporal inicial, alimentadas 0,5 (subnutridas □) o 1,5 (control ■) veces los requerimientos de mantenimiento al día 5 de gestación. EL = epitelio luminal, EGs = epitelio glandular superficial, EGp = EG profundo, Es = estroma superficial, Ep = estroma profundo

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió el efecto de la subnutrición sobre la calidad embrionaria, la sensibilidad uterina a la P4 y al E2, y la concentración de las hormonas esteroideas en ovejas preñadas con diferentes reservas corporales al inicio del experimento. El hallazgo más relevante de esta tesis fue que animales con diferente condición corporal al inicio del experimento muestran diferente respuesta biológica: ovejas de alta-CCi presentaron mayores concentraciones plasmáticas de P4, mayor número de embriones recuperados y mayor tasa de viabilidad embrionaria.

Pudimos observar que la subnutrición a la mitad de los requerimientos para mantenimiento provocó una disminución de 6 kg de PV en las ovejas de alta-CCi (CCi: 2,9) y de 7,3 kg en las ovejas de baja-CCi (CCi: 2,1). Resultados similares se encontraron cuando se realizaron tratamientos de subnutrición semejantes: ovejas con mejor CC (3,4) perdieron 5 kg de PV (Sosa et al., 2009), mientras que ovejas más delgadas (CC de 2,9 y 2,8) perdieron 6,8 y 7 kg respectivamente (Sosa et al., 2004; Sosa et al., 2006). Esto podría deberse a que animales más engrasados (mayor CC y PV) presentan un mayor porcentaje de lípidos corporales (Caldeira y Portugal, 2007), obteniendo más energía por kg de PV movilizado debido a la mayor concentración energética de las grasas frente a proteínas o carbohidratos (2 a 2,5 veces mayor) (Williams, Oltenacu y Sniffen, 1989). Por otra parte, las ovejas controles de alta-CCi mantuvieron su PV coincidiendo con trabajos previos (Sosa et al., 2004; Sosa et al., 2006). Sin embargo, en esta tesis vimos que las ovejas controles de baja-CCi aumentaron su PV probablemente como una respuesta compensatoria frente a la restricción alimenticia anterior.

Durante un balance energético negativo (BEN), como ocurre durante la subnutrición, se generan numerosos cambios en las concentraciones hormonales y en la sensibilidad de los tejidos, con el fin de mantener el equilibrio del ambiente interno y/o sustentar las funciones productivas (teleforesis) (Chilliard, Bocquier y Doreau, 1998). Desde hace varias décadas, ha quedado bien establecida y demostrada la estrecha relación existente entre el estado metabólico de los animales y su respuesta reproductiva, expresada a diferentes niveles: a nivel del sistema nervioso central (hipotálamo, hipófisis), a nivel ovárico y a nivel del tracto reproductivo (oviducto-útero). En este sentido, varias hormonas metabólicas como los IGFs (Keller, Roberts y Seidel, 1998; Wathes, Reynolds, Robinson y Stevenson, 1998), la insulina (Downing, Joss, Connell y Scaramuzzi, 1995; Gardner y Kaye, 1991; Harvey y Kaye, 1990), la leptina (Moschos, Chan y Mantzoros, 2002; Kawamura et al., 2002), y la adiponectina (Sequeira et al., 2016) han sido postuladas como posibles mediadores entre el estado energético, el sistema reproductivo y el embrión. En nuestro trabajo encontramos que ovejas de alta-CCi presentaron mayores concentraciones de insulina e IGF-1 respecto a ovejas de baja-CCi (datos no mostrados en esta tesis; Fernández-Foren et al., 2019). Debido a que estas hormonas potencian el crecimiento folicular y se ha evidenciado que aumentan luego de realizar una suplementación (flushing, tratamiento realizado para estimular la tasa ovulatoria Habibizad, Riasi, Kohram y Rahmani, 2015; Scaramuzzi et al., 2006), podemos sugerir que la mayor proporción de ovejas de alta-CCi que presentaron más de un CL en comparación con las de baja-CCi, puede estar explicado en parte por los niveles de IGF-1 e insulina de estos animales, asociado a un mejor estado metabólico en este grupo animal. Asimismo, se ha reportado previamente que el número de ovulaciones afecta significativamente los niveles de P4

(Asworth et al., 1989), lo cual es consistente con los mayores niveles de P4 encontrados en las ovejas de alta-CCi, que además es el grupo de animales con una mayor proporción de CL. Es conocido que la P4 estimula el crecimiento y desarrollo embrionario en rumiantes (Spencer, Johnson, Bazer, Burghardt y Palmarini, 2007), por lo que las mayores concentraciones plasmáticas de P4 en las ovejas de alta-CCi son consistentes con el mayor número de embriones recuperados y las mayores tasas de viabilidad embrionaria en este grupo. En este sentido, de Brun et al., (2016) en un experimento en el que se transfirieron embriones, reportaron que las ovejas subnutridas que mantuvieron la preñez, presentaron mayor concentración de P4 al día 7 asociado a una mayor tasa ovulatoria en comparación con ovejas subnutridas que no mantuvieron la preñez.

En esta tesis, con monta natural, se puede hipotetizar que las ovejas de alta-CCi presentaron un mayor número de ondas foliculares con ovocitos más jóvenes y de mayor fertilidad, como fue sugerido anteriormente (Viñoles et al., 2010), que dieron lugar a mayores proporciones de CL y concentraciones de P4, lo que favoreció la viabilidad embrionaria en este grupo. En experimentos conceptualmente similares, Soca, Carriquiry, Claramunt, Rupprechter y Meikle. (2013) observaron mayores tasas de preñez temprana y global en vacas de CC moderada en relación a las de CC baja y en animales expuestos a la suplementación en relación a los controles. Este resultado es consistente con el concepto de que el cerebro integra tanto la información de las reservas corporales (memoria metabólica) como las señales de la ingesta actual de energía para poder soportar los futuros desafíos medioambientales del ciclo reproductivo (Blanc et al., 2006). En el trabajo de Adrien et al. (2012), los resultados de ciclicidad ovárica van en el mismo sentido, reportando que la probabilidad de ciclar de las vacas se vio afectada por la CC de los animales 30 días antes del parto, siendo las vacas de menor CC las que presentan anestros más largos. Por lo tanto, es claro que el tracto reproductivo de los rumiantes parece ser capaz de detectar el estado metabólico (señales endócrinas) y adaptar su fisiología en consecuencia, determinando así el posible éxito o fracaso de la preñez (Meikle et al., 2018).

El tratamiento nutricional en nuestro estudio no afectó el número de CL ni la concentración de P4 en plasma. Esto contrasta con estudios anteriores (Abecia et al., 2006), pero se debe tener en cuenta que el presente trabajo incluyó solo una determinación hormonal (día 5), a diferencia de los muestreos diarios realizados por otros autores donde encuentran que animales subnutridos tienen mayores concentraciones de P4 plasmática, en la fase luteal media y tardía (Lozano et al., 1998). Curiosamente, si bien el contenido endometrial de P4 no se vio afectado por la CCi, las ovejas subnutridas tendieron a presentar una menor concentración endometrial de P4 (Lozano et al., 1998; Sosa et al., 2006), afirmando la idea de que las concentraciones periféricas de P4 son un pobre reflejo de la cantidad de P4 que hay en el útero. Dado el rol esencial que tiene la P4 en el sustento de la preñez, esto podría estar asociado con el menor número de embriones recuperados en las ovejas subnutridas. Asimismo, la concentración endometrial de E2 tendió a ser mayor en las ovejas subnutridas respecto a los controles. Este resultado podría asociarse con los efectos negativos de la subnutrición sobre el desarrollo folicular, como fue reportado por Sosa, Gonzalez-Bulnes, Abecia, Forcada y Meikle. (2010), quienes observaron que los folículos ovulatorios grandes, al momento de la retirada de las esponjas con progestágenos, persistieron estáticos si bien la mayoría alcanzó la ovulación. Es probable que el tiempo de crecimiento prolongado de estos folículos haya alterado la forma de secreción de E2 circulante – más tardía – que no se pudo comprobar en la

presente tesis por no tener las determinaciones de E2 en plasma. Este mecanismo podría explicar la mayor concentración de E2 – y menor de P4 – encontrada en el útero de ovejas subnutridas. Por lo expuesto anteriormente, se podría proponer un desfase en los tiempos uterinos, siendo más retrasado en las ovejas subnutridas, lo que es consistente con el menor número de embriones recuperados.

La sensibilidad de un tejido a las hormonas depende del número y de la afinidad de los receptores de las hormonas presentes en el mismo. Por lo tanto, los factores que afecten la expresión o la función de los receptores pueden afectar la función del tejido. La técnica de inmunohistoquímica permite conocer la localización tisular de las proteínas medidas, haciéndola una técnica única en este sentido. La intensidad de tinción para PR y ER α en el útero al día 5 de la preñez no estuvo afectada por la CCi ni por el tratamiento nutricional. En este sentido, Sosa et al., (2006) reportaron que, en general, los análisis inmunohistoquímicos no revelaron diferencias en ER α o PR debidas al tratamiento nutricional, pero observaron una menor inmunoreactividad de ER α en el epitelio luminal y glandular superficial de las ovejas cíclicas subnutridas en los días 5 y 14 del ciclo. Por otro lado, también en animales cíclicos, Sosa et al., (2004) reportaron una disminución en la inmunotinción de PR en la mayoría de los tipos celulares del útero en ovejas subnutridas el día 5 luego del celo y ningún cambio en ER α . Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que investiga el efecto de la subnutrición sobre la expresión de estas proteínas en el útero en animales preñados en el día 5 de gestación, momento en el que el embrión llega al útero y es dependiente en gran medida de los fluidos maternos (Ashworth, 1995). La tendencia a una menor concentración de P4 en el útero de las ovejas subnutridas no podría explicarse por una menor retención por parte de los receptores específicos (Katzenellenbogen, 1980), ya que el contenido de PR fue similar entre grupos. Se ha reportado que los anticuerpos reconocen la región expuesta solo cuando el receptor se encuentra activado (Ise et al., 2010). Por otro lado, Sosa et al., (2006) reportaron una menor capacidad de unión uterina del PR en las ovejas subnutridas en el día 5 del ciclo estral, a pesar de la ausencia de efectos encontrados sobre el ARNm y la inmunotinción de PR. Por lo tanto, es posible que la menor concentración uterina de P4 encontrada en ovejas subnutridas se deba a un menor contenido de PR activado y/o a una menor capacidad de unión -no detectado por nuestro método de inmunohistoquímica-, lo que conlleva a una funcionalidad uterina alterada, y, por consiguiente, un menor número de embriones recuperados.

Cabe mencionar que el mayor número de embriones recuperados, la mayor viabilidad embrionaria, la mayor concentración plasmática de P4, y, la mejor respuesta endócrino-metabólica a la subnutrición observada en ovejas de alta CC demuestra que la condición corporal inicial de los animales repercutió en la eficiencia reproductiva (Fernández-Foren et al., 2019). Estos resultados nos permiten sugerir que los efectos negativos causados por una restricción alimenticia sobre la reproducción, serán menos marcados en animales que tienen una buena condición corporal inicial. Por lo tanto, con esta tesis logramos demostrar el impacto que tiene la memoria metabólica sobre la restricción nutricional, y su asociación con la reproducción, aportando elementos que remarcan la importancia de la disponibilidad de forraje en momentos críticos del ciclo reproductivo del ovino.

8. CONCLUSIONES

- Las ovejas de alta condición corporal presentaron una mayor proporción de cuerpos lúteos y mayor concentración plasmática de progesterona, consistente con un mayor número de embriones recuperados y tasa de viabilidad embrionaria respecto a ovejas de baja condición corporal.
- La subnutrición a la mitad de los requerimientos de mantenimiento disminuyó las concentraciones uterinas de progesterona y aumentó las concentraciones de estradiol. Esto sugiere que los animales subnutridos presentan tiempos uterinos alterados, lo que concuerda con la menor recuperación de embriones en estos animales.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecia, J.A., Forcada, F., Zarazaga L., y Lozano, J.M. (1993). Effect of plane of protein after weaning on resumption of reproductive activity in Rasa Aragonesa ewes lambing in late spring. *Theriogenology*, 39(2), 463-473.
- Abecia, J.A., Rhind, S.M., Bramley, T.A., y McMillen, S.R. (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. *Animal Science*, 61, 57-62.
- Abecia, J.A., Rhind, S.M., Goddard, P.J., Mcmillen, S.R., Ahmadi, S., y Elston, D.A. (1996). Jugular and ovarian venous profiles of progesterone and associated endometrial progesterone concentrations in pregnant and non-pregnant ewes. *Animal Science*, 63, 229-234.
- Abecia, J.A., Lozano, J.M., Forcada, F., y 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. *Animal Reproduction Science*, 48, 209-18.
- Abecia, J.A., Forcada, F. y Lozano, J.M. (1999). 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.
- Abecia, J.A., Sosa, C., Forcada, F., y Meikle, A. (2006). The effect of undernutrition on the establishment of pregnancy in the ewe. *Reproduction, nutrition, development*, 46, 367-78.
- Abecia, J.A., Forcada, F., Palacín, I., Sanchez-Prieto, L., Sosa, C., Fernández-Foren, A. y Meikle, A. (2013). Undernutrition affects embryo quality of superovulated ewes. *Zygote*, 1-9.
- Adrien, M.L., Mattiauda, D.A., Artegoitia, V., Carriquiry, M., Motta, G., Bentancur O. y Meikle, A. (2012). Nutritional regulation of body condition score at the initiation of

- the transition period in primiparous and multiparous dairy cows under grazing conditions: milk production, resumption of post-partum ovarian cyclicity and metabolic parameters. *Animal*, 6(2), 292-299.
- Ashworth, C.J., Sales, D.I. y Wilmut, I. (1989). Evidence of an association between the survival of embryos and the periovulatory plasma progesterone concentration in the ewe. *J Reprod Fert*, 87, 23-32.
- Ashworth, C.J. (1995). Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. *Livest Prod Sci*, 44, 99-105.
- Barrington, E.J.W (2019). Hormone. *Encyclopaedia Britannica*. Tewkesbury: The Editors of Encyclopaedia Britannica.
- Blache, D., Zhang, S. y Martin, G.B. (2006). Dynamic and integrative aspects of the regulation of reproduction by metabolic status in male sheep. *Reprod Nutr Dev*, 46(4), 379-390.
- Blanc, F., Bocquier, F., Agabriel, J., D'Hour, P. y Chilliard, Y. (2006). Adaptive abilities of the females and sustainability of ruminant livestock systems. A review. *Anim Res*, 55, 489-510.
- Boland, M.P., Lonergan, P. y O'Callaghan, D. (2001). Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology*, 55, 1323-1340.
- Brien, F.D., Cumming, I.A., Clarke, I.J. y Cocks, C.S. (1981). Role of plasma progesterone concentration in early-pregnancy of the ewe. *Aust J Exp Agr*, 21, 562-565.
- Buhi, W.C., Alvarez, I.M. y Kouba, A.J. (1997). Oviductal regulation of fertilization and early embryonic development. *J Reprod Fert*, 52, 285-300.
- Caldeira, R.M., Belo, A.T., Santos, C.C., Vazques, M.I. y Portugal, A.V. (2007). The effect of long-term feed restriction and over-nutrition on body condition score, blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Rumin Res*, 68, 242-255.
- Carter, F., Forde, N., Duffy, P., Wade, M., Fair, T., Crowe, M. A., y Lonergan, P. (2008). Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(3), 368-375.
- Chilliard, Y., Bocquier, F., y Doreau, M. (1998). Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reprod Nutr Dev*, 38(2), 131-152.
- Chilliard, Y., Delavaud, C. y Bonnet, M. (2005). Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest Anim Endocrinol*, 29(1), 3-22.
- Clark, J.H. y Mani, S.K. (1994). Actions of ovarian steroid hormones. En E. Knobil y J.D. Neill (Eds.) *The Physiology of Reproduction*. (pp. 1011-1046). New York: Raven Press.
- Comer, M. T., Leese, H. J., y Southgate, J. (1998). Induction of a differentiated ciliated cell phenotype in primary cultures of Fallopian tube epithelium. *Human reproduction*, 13(11), 3114-3120.
- Conneely, O.M., Mulac-Jericevic, B., Lyndon, J.P. y Mayo, F.D. (2001). Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. *Mol Cell Endocrinol*, 179, 97-103.
- de Brun, V., Meikle A, Fernández-Foren, A., Forcada, F., Palacín, I., Menchaca, A., Sosa, C. y Abecia, J.A. (2016). Failure to establish and maintain a pregnancy in undernourished recipient ewes is associated with a poor endocrine milieu in the early luteal phase. *Anim Reprod Sci*, 173,80-6.

- Diskin, M. G., y Morris, D. G. (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 260-267.
- Downing, J.A., Joss, J., Connell, P. y Scaramuzzi, R.J. (1995). Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes fed lupin grain. *J Reprod Fertil*, 103(1), 137-145.
- Fawcett, D.W. (1988). Sistema reproductor femenino. En *Tratado de histología* (pp. 909-912). Madrid: Interamericana-McGraw Hill.
- Fernández Abella, D.H. (1993). *Principios de Fisiología Reproductiva Ovina*. Montevideo: Hemisferio Sur.
- Fernández-Foren A., Abecia J.A., Vázquez M.I., Forcada F., Sartore I., Carriquiry M., Meikle A. y Sosa C. (2011). Restricción alimenticia en ovinos: respuesta endocrino-metabólica dependiente de las reservas corporales. *ITEA*, 170(4), 257-271.
- Fernández-Foren, A., Sosa, C., Abecia, J.A., Vázquez, M.I., Forcada, F. y Meikle, A. (2019) Dietary restriction in sheep: Uterine functionality in ewes with different body reserves during early gestation. *Theriogenology*, 135, 189-197.
- Fleming, T.P., Kwong, W.Y., Porter, R., Ursell, E., Fesenko, I., Wilkins, A., Miller, D.J., Watkins, A.J. y Eckert, J.J. (2004). The embryo and its future. *Biol Reprod*, 71, 1046-54.
- García Sacristán, A., Castejón Montijano, F., De la Cruz Palomino, L.F., Gonzalez Gallego, J., Murillo López de Silanes, M.D., y Salido Ruiz, G. (1998). *Fisiología Veterinaria*. Madrid: Interamericana.
- Gardner, H.G. y Kaye, R.L. (1991). Insulin stimulates mitosis and morphological development in preimplantation mouse embryos. *Reprod Fertil Dev*, (3) 457-461.
- Garrett, J. E., Geisert, R. D., Zavy, M. T., y Morgan, G. L. (1988). Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 84(2), 437-446.
- Geisert, R.D., Morgan, G.L., Short, E.C. y Jr. Zavy MT. (1992). Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. *Reprod Fertil Dev*, 4, 301-5.
- Gimpl, G., Wiegand, V., Burger, K. y Fahrenholz, F. (2002). Cholesterol and steroid hormones: modulators of oxytocin receptor function. *Prog Brain Res*, 139, 43-55.
- Goff, A.K. (2002). Embryonic signals and survival. *Reprod Domest Anim*, 37, 133-139.
- Goodman, R.L. (1994). Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. En *Physiol Reprod*. (Eds Knobil, E. y Neill, J.D.) (pp. 659-709). New York: Raven Press.
- Graham, J.D. y Clarke, C.L. (1997). Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. *Endocr Rev*, 18, 502-519.
- Graña-Baumgartner, A., Meikle, A., Fernández-Foren, A., Neimaur, K., Barrera N., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P.C., Bosolasco, D., Núñez-Olivera, R., Crispo, M., Menchaca, A. y de Brun, V. (2020). Local influence of the corpus luteum on the ipsilateral oviduct and early embryo development in the ewe. *Theriogenology*, 151, 7-15.
- Gray, C. A., Taylor, K. M., Ramsey, W. S., Hill, J. R., Bazer, F. W., Bartol, F. F., y Spencer, T. E. (2001). Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. *Biology of Reproduction*, 64(6), 1608-1613.
- Habibizad, J., Riasi, A., Kohram, H. y Rahmani, H.R. (2015). Effect of long-term or short-term supplementation of high energy or high energy-protein diets on ovarian follicles and blood metabolites and hormones in ewes. *Small Rumin Res*, 132, 37-43.
- Hafez, E.S. (1996). Anatomía del aparato reproductor femenino. En *Reproducción e inseminación artificial en animales* (pp. 20-52). Madrid: Interamericana-McGraw Hill.

- Hapangama, D.K, Kamal, A.M. y Bulmer, J.N. (2015). Estrogen receptor β : the guardian of the endometrium. *Hum Reprod Update*, 21(2), 174–193.
- Harvey, M.B. y Kaye, P.L. (1990). Insulin increases the cell number of the inner cell mass and stimulates morphological development of mouse blastocysts in vitro. *Development*, 110(3), 963-967.
- Irigoyen, A. (2005). Pérdida de peso en la comercialización del ganado. *Revista Angus*, Bs. As, 229, 56-60.
- Ise, N., Omi, K., Miwa, K., Honda, H., Higashiyama, S. y Goishi, K. (2010). Novel monoclonal antibodies recognizing the active conformation of epidermal growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 394, 685–690.
- Jefferies, B.C. (1961). Body condition scoring and its use in management. *Tasm. J. Agr*, 32, 19-211.
- Katzenellenbogen. (1980). Dynamics of steroid hormone receptor action. *Annu Rev Physiol*, 42,17-35.
- Kawamura, K., Sato, N., Fukuda, J., Kodama, H., Kumagai, J., Tanikawa, H., Nakamura, A. y Tanaka, T. (2002). Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology*, 143, 1922-1931.
- Keller, M.L., Roberts, A.J. y Seidel, G.E. (1998). Characterization of insulin-like growth factorbinding proteins in the uterus and conceptus during early conceptus elongation in cattle. *Biol Reprod*, 59(3), 632-642.
- Leese, H.J. (1995). Metabolic control during preimplantation mammalian development. *Hum Reprod Update*,1(1), 63-72.
- Leese, H.J. (2005). Rewards and risks of human embryo creation: a personal view. *Reprod Fertil Dev*,17, 387-91.
- Lonergan, P. (2011). Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology*, 76(9), 1594-1601.
- Lozano, J.M., Abecia, J.A, Forcada, F., Zarazaga, L. y 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.
- Lozano, J.M., Lonergan, P. Boland, M.P y O'callaghan, D. (2003). Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reprod* 125, 543-553
- Mann, G.E., y Lamming, G.E. (1999). The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 34(3-4), 269-274.
- Mann, G. E., y Lamming, G. E. (2001). Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*, 121(1), 175-180.
- Martin, G.B., Milton J.T., Davidson, R.H., Banchemo Hunzicker, G.E., Lindsay, D.R. y Blache, D. (2004). Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 231-245.
- Maslar, I.A. (1988). The proggestational endometrium. En *Seminars in Reproductive Endocrinology* (pp. 115-128). Nueva York: Thieme Medical Publishers.
- McNeill, R. E., Diskin, M. G., Sreenan, J. M., y Morris, D. G. (2006). Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. *Theriogenology*, 65(7), 1435-1441.
- Meikle, A., Bielli, A., Masironi, B., Pedrana, G., Wang, H., Forsberg, M. y 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, 587-96.
- Meikle, A., Tasende, C., Sosa, C. y Garofalo, E.G. (2004). The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. *Reprod Fertil Dev*, 16, 385-94

- Meikle, A., de Brun, V., Carriquiry, M., Soca, P., Sosa, C., Adrien, M.L., Chilbroste, P., Abecia, J.A. (2018). Influences of nutrition and metabolism on reproduction of the female ruminant. *Anim Reprod* 15(1),899-911.
- Moschos, S., Chan, J.L. y Mantzoros, C.S. (2002). Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril*, 77(3), 433-444.
- Murray, M.K. (1992). Biosynthesis and immunocytochemical localization of an estrogen-dependent glycoprotein and associated morphological alterations in the sheep ampulla oviduct. *Biol Reprod*, 47, 889-902.
- Murray, M.K., y Sower, S.A. (1992). Estrogen-and progesterone-dependent secretory changes in the uterus of the sheep. *Biology of Reproduction*, 47(6), 917-924.
- Murray, M.K. (1995). Epithelial lining of the sheep ampulla oviduct undergoes pregnancy-associated morphological changes in secretory status and cell height. *Biology of Reproduction*, 53(3), 653-663.
- Murray, M.K. (1997). Morphological features of epithelial cells in the sheep isthmus oviduct during early pregnancy. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 247(3), 368-378.
- Niswender, G.D. y Nett, T.M. (1994). Corpus luteum and its control in infraprimates species. In *Physiol Reprod*. (Eds Knobil, E. y Neill, J.D.) pp. 781- 816. New York: Raven Press.
- Noakes, D.E., Parkinson, T.J. y England, G.C.W. (2001). Endogenous and exogenous control of ovarian cyclicity. En *Veterinary reproduction and obstetrics*. (8ª ed., pp.1-53). London: Sanders.
- O'Callaghan, D. y Boland, M.P. (1999). Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Animal Sci*, 68, 299- 314.
- Paria, B.C., Dey, S.K. (1990). Preimplantation embryo development in vitro: *Cooperative interactions among embryos and role of growth factors*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 4756-4760.
- Parr, R.A. (1992). Nutrition-progesterone interactions during early pregnancy in sheep. *Fertil Develop*, 4, 297-300.
- Parr, R. A., Davis, I. F., Fairclough, R. J. y Miles, M. A. (1987). Overfeeding during early pregnancy reduces peripheral progesterone concentration and pregnancy rate in sheep. *J Reprod Fertil*, 80, 317-320.
- Parr, R. A., Davis, I.F., Miles, M.A. y Squires, T.J. (1993). Feed intake affects metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Res Vet Sci*, 55(3),306-310.
- Quintela, L.A., Díaz, C., Herradón, P.G., Peña, A.I., y Becerra, J.J. (2006). *Ecografía y reproducción en la vaca*. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela.
- Renaville, R., Hammadi, M. y Portetelle, D. (2002). Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domest Anim Endocrinol*, 23(1-2), 351-360.
- Rhind, S.M., Martin, G.B., McMillen, S., Tsonis, C.G. y McNeilly, A.S. (1989a). Effect of level of food intake of ewes on the secretion of LH and FSH on the pituitary response to gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes. *J Endocrinol*, 121, 325-330.
- Rhind, S.M., Mcmillen, S., Wetherill, G.Z., Mckelvey, W.A.C. y Gunn, R.G. (1989c) 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.
- Roche, J.F., Boland, M.P. y Mcgeady, T.A. (1981). Reproductive wastage following artificial insemination of heifers. *Vet Rec*, 109, 401-404.

- Russel, A.J.F., Doney, J.M. y Gunn, R.G. (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *J Agr Sci*, 72, 451-454
- Russel, A.J.F. (1984). Body condition scoring of sheep. *Vet Rec*, 6 (3), 91- 93.
- Satterfield, M. C., Bazer, F. W., y Spencer, T. E. (2006). Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. *Biology of Reproduction*, 75(2), 289-296.
- Scaramuzzi, R.J., Campbell, B.K., Downing, J.A., Kendall, N.R., Khalid, M., Munoz Gutierrez, M. y Somchit, A. (2006). A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev*, 46, 339-354.
- Senger, P.L. (2005). *Pathways to Pregnancy and Parturition*. (2^a ed., pp 381) Redmond: Pullman Current Conception.
- Sequeira, M., Pain, S.J., de Brun, V., Meikle, A., Kenyon, P.R. y Blair, H.T. (2016). Gestation related gene expression and protein localization in endometrial tissue of Suffolk and Cheviot ewes at gestation Day 19, after transfer of Suffolk or Cheviot embryos. *Theriogenology*, 86(6), 1557-1565.
- Shupnik, M.A. (1997). Steroid & thyroid hormone receptors. *Introduction to molecular & cellular research*. Washington: The Endocrine Society.
- Sosa, C., Lozano, J.M., Viñoles, C., Acuna, S., Abecia, J.A., Forcada, F., Forsberg, M. y Meikle, A. (2004). Effect of plane of nutrition on endometrial sex steroid receptor expression in ewes. *Anim Reprod Sci*, 84(3-4), 337-348.
- Sosa, C., Abecia, J.A., Forcada, F., Viñoles, C., Tasende, C., Valares, J.A., Palacin, I., Martin, G.B. y 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(4), 447-458.
- Sosa, C., Abecia, J.A., Forcada, F. y Meikle, A. (2008). Undernutrition reduces the oviductal mRNA expression of progesterone and oestrogen receptors in sheep. *J Vet Med Sci*, 175 (3), 413 – 415.
- Sosa, C., Abecia, J.A., Carriquiry, M., Forcada, F., Martin, G.B., Palacin, I. y Meikle, A. (2009). Early pregnancy alters the metabolic responses to restricted nutrition in sheep. *Domest Anim Endocrinol*, 36 (1), 13-23.
- Sosa, C., Gonzalez-Bulnes, A., Abecia, J.A., Forcada, F. y Meikle, A. (2010). Short-term undernutrition affects final development of ovulatory follicles in sheep synchronized for ovulation. *Reprod Domest Anim*, 45(6), 1033-8.
- Soca, P., Carriquiry, M., Claramunt, M., Rupprechter, G. y Meikle, A. (2013). Metabolic and endocrine profiles of primiparous beef cows grazing native grassland. 2. Effects of body condition score at calving, type of suckling restriction and flushing on plasmatic and productive parameters. *Anim Prod Sci*, 54(7), 862-868.
- Spencer, T.E., Johnson, G.A., Bazer, F.W. y Burghardt, R.C. (2004). Implantation mechanisms: insights from the sheep, 128(6), 657-68.
- Spencer, T.E., Johnson, G.A., Bazer, F.W., Burghardt, R.C. y Palmarini, M. (2007). Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod Fertil Dev*, 19, 65-78.
- Stewart, C.L. y Cullinan, E.B. (1997). Preimplantation development of the mammalian embryo and its regulation by growth factors. *Dev Genet*, 21, 91-101.
- Stronge, A. J. H., Sreenan, J. M., Diskin, M. G., Mee, J. F., Kenny, D. A., y Morris, D. G. (2005). Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*, 64(5), 1212-1224.

- Ungerfeld, R. (2002). Control endocrino del ciclo estral. En: Ungerfeld, R. *Reproducción en los animales domésticos*, (pp. 39- 53). Montevideo: Melibea.
- Ungerfeld, R. (2011). *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo: Melibea.
- Ungerfeld, R. (2020). *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo: Edra.
- Viñoles, C., Banchemo, G., Quintans, G., Pérez-Clariget, R., Soca, P., Ungerfeld, R., Bielli, A., Fernández Abella, D., Formoso, D., Pereira Machín, M. y Meikle, A. (2009). Estado actual de la investigación vinculada a la Producción Animal Limpia, Verde y Ética en Uruguay. *Agrociencia*, 13(3),59 –79.
- Viñoles, C., Paganoni, B., Glover, K.M.M., Milton, J.T.B., Blache, D., Blackberry, M.A. y Martin, G.B. (2010). The use of a ‘first-wave’ model to study the effect of nutrition on ovarian follicular dynamics and ovulation rate in the sheep. *Reproduction*, 140, 865–874.
- Wathes, D.C., Reynolds, T.S., Robinson, R.S. y Stevenson, K.R. (1998). Role of the insulinlike growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. *J Dairy Sci*, 81, 1778-89.
- Watson, A.J., Wischusen, M.E. y Winger, Q.A. (1999). IGF paracrine and autocrine interactions between conceptus and oviduct. *J Reprod Fertil Suppl*, 54, 303-315.
- Williams CB, Oltenacu PA y Sniffen CJ. (1989). Refinements in determining the energy value of body tissue reserves and tissue gains from growth. *J Dairy Sci* 72(1): 264-269.
- Wintenberger-Torres, S., Flechon, J.E. (1974). Ultrastructural evolution of the trophoblast cells of the pre-implantation sheep blastocyst from day 8 to day 18: *J Anat* 118, 143-53
- Winterberger-Torres, S. y Sevellec, C. (1987). *Atlas of the early development of the sheep embryo.*, Paris: INRA.
- Yániz, J.L., Lopez-Gatius, F., Santolaria, P., y Mullins, K.J. (2000). Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 260(3), 268-278.
- Zhang, S., Dominique Blache, M.A.y Blackberry Graeme, B.M. (2005). Body reserves affect the reproductive endocrine responses to an acute change in nutrition mature male sheep. *Anim Reprod Sci*, 88, 257-269.