

**Facultad de Veterinaria
Universidad de Zaragoza**



Tesis Doctoral

**LA SUBNUTRICIÓN Y EL AMBIENTE MATERNO DURANTE EL CICLO
SEXUAL Y LA GESTACIÓN TEMPRANA EN OVINOS**

María Cecilia Sosa Misuraca

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos
Facultad de Veterinaria
Universidad de Zaragoza
España

Departamento de Biología Molecular y Celular
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

Zaragoza, 2007



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento Producción Animal

y Ciencia de los Alimentos

Producción Animal

José Alfonso Abecia Martínez, director del trabajo de Tesis Doctoral de **María Cecilia Sosa Misuraca** que lleva por título "LA SUBNUTRICIÓN Y EL AMBIENTE MATERNO DURANTE EL CICLO SEXUAL Y LA GESTACIÓN TEMPRANA EN OVINOS" considera que dicho trabajo cumple los requisitos necesarios para que pueda ser presentada con el objetivo de optar al Grado de Doctora en Veterinaria. En este sentido, el trabajo presentado se corresponde totalmente con el Proyecto de Tesis que fue aprobado en su momento.

Zaragoza, a seis de junio de 2007

Fdo: José Alfonso Abecia Martínez

Director de la Tesis

Este trabajo de tesis se presenta como requisito para la obtención del título de Doctora en Veterinaria.

Los experimentos aquí expuestos han recibido **financiación** de la C.Y.C.I.T. a través de los Proyectos AGL2001-1817 y AGL2004-00432/GAN, y de la D.G.A. a través del Proyecto A26.

La autora ha disfrutado de una **beca predoctoral** "Estancias para realizar estudios de doctorado dirigidas a estudiantes latinoamericanos" otorgada por el Santander Central Hispano en colaboración con la Universidad de Zaragoza. Período 2004-2007.

Se reconoce especialmente la labor de la **Dra. Ana Meikle**, del Departamento de Biología Molecular y Celular de la Facultad de Veterinaria, Uruguay, ya que ha sido codirectora *de facto* de la presente tesis. Por motivos meramente administrativos no pudo ser reconocida oficialmente como tal. Vaya desde aquí nuestro más profundo agradecimiento.

RESUMEN

En esta tesis se presentan los resultados derivados de la investigación de los efectos de la subnutrición sobre la expresión génica de los oviductos y el endometrio durante el ciclo sexual o la gestación temprana en ovejas adultas.

A partir de los antecedentes evidenciando que las ovejas subnutridas presentan menores tasas de gestación y retraso en el desarrollo de sus embriones, y que presentan menores concentraciones de progesterona en el endometrio, la hipótesis de partida de los trabajos de esta tesis fue que el menor contenido de progesterona endometrial en la fase luteal temprana (día 5) podía deberse a un menor contenido endometrial de receptores de progesterona (PR) ya que los receptores concentran las hormonas en los tejidos diana. En el *Artículo I* se estudió la expresión endometrial de los PR y de los receptores de estrógenos (ER α) (por inmunohistoquímica) en ovejas subnutridas a la mitad de sus requerimientos diarios para mantenimiento y se encontró que éstas presentaban una menor expresión de PR el día 5 pero no el día 10 del ciclo sexual, confirmando la hipótesis previa. Se sugirió que la menor expresión de PR podía deberse a la acción de hormonas metabólicas actuando como mediadoras entre el estado metabólico y la reproducción.

En el *Artículo II*, se analizó integralmente la expresión de PR y ER (localización celular, expresión de transcriptos y capacidad de unión) y se estudiaron las concentraciones plasmáticas de varios metabolitos y hormonas metabólicas (insulina, IGF-I, leptina) para relacionarlos con las determinaciones de los receptores. En este estudio se encontró una capacidad de unión de PR y ER reducida el día 5 del ciclo en las ovejas subnutridas, sin observarse cambios en la expresión de los transcriptos, sugiriendo que la menor expresión de los receptores probablemente se debía a causas post-trascripcionales. No se observaron diferencias el día 14 del ciclo, que es un momento clave ya que alrededor de ese día se decide el destino del cuerpo lúteo. La subnutrición aumentó las concentraciones de ácidos grasos no esterificados, y disminuyó las concentraciones de insulina, IGF-I y leptina. Esta disminución de IGF-I y leptina podría ser una posible explicación para la menor expresión de los receptores esteroideos, ya que se ha descrito que estas hormonas son capaces de activarlos independientemente del ligando.

El *Artículo III* confirmó la hipótesis de que la subnutrición afecta la expresión génica del tracto reproductivo, ya que se encontró una menor concentración de transcriptos de ER α el día 5, y de PR los días 5 y 14, en los oviductos ipsilaterales al cuerpo lúteo. Junto con los resultados de los artículos anteriores, estos resultados

reafirmaron el concepto de que la subnutrición altera el ambiente materno para un posible embrión, y podrían explicar, al menos parcialmente, el retraso en el desarrollo embrionario observado en las ovejas subnutridas. Por otro lado, las ovejas subnutridas presentaban el mismo número de embriones los días 8 y 9 de gestación y no presentaban menores tasas de gestación sino hasta los días 14 y 15. Para demostrar la hipótesis de que la subnutrición podría afectar alguno de los mecanismos endometriales implicados en el reconocimiento materno de la gestación el día 14, se estudió el efecto de la subnutrición sobre la expresión endometrial de PR, ER α , de los receptores de oxitocina y de interferón tau, y de la ciclooxygenasa-2 en ovejas gestantes. En el *Artículo IV* no se confirmó esta hipótesis ya que no se observó un efecto marcado de la subnutrición sobre los mecanismos de reconocimiento materno de la gestación en ovejas gestantes. Los resultados surgidos de la presente tesis, sugieren que una expresión génica alterada en el tracto reproductivo de ovejas subnutridas el día 5 podría ser la causa del retraso en el desarrollo embrionario que se ha observado en ovejas subnutridas con anterioridad.

SUMMARY

In this thesis, the results from the investigation of the effects of undernutrition on endometrial and oviductal gene expression during the oestrous cycle and early pregnancy in adult sheep, are presented. Since undernourished ewes present lower pregnancy rates and retarded embryo development, and as they present lower endometrial progesterone concentrations, our starting hypothesis was that the lower endometrial progesterone content could be due to lesser expression of progesterone receptors (PR), since receptors concentrate the specific hormones in the target tissues.

In *Paper I*, the endometrial expression of PR and oestrogen receptor (ER α) in ewes fed half the daily requirements for maintenance was studied. It was found that these ewes presented lesser expression of PR on day 5 but not on day 10 of the oestrous cycle, confirming the initial hypothesis. It was suggested that the lesser expression of PR could be due to the action of metabolic hormones acting as mediators between metabolic status and reproduction.

In *Paper II*, PR and ER expression was analysed (cellular localisation, transcript expression and binding capacity) and plasma concentrations of several metabolites and metabolic hormones were studied (insulin, IGF-I, leptin), in order to relate them to receptor function. In this study, a reduced binding capacity of PR and ER on day 5 of the oestrous cycle was found, without changes in transcript expression, suggesting that the lesser expression of the receptors was probably due to post-transcriptional events. No differences were observed on day 14 of the cycle –a key moment in which the fate of the corpus luteum is defined-. Undernutrition increased the concentrations of non esterified fatty acids and reduced insulin, IGF-I and leptin concentrations. The reduction in IGF-I and leptin concentrations could be a possible explanation for the lesser steroid receptor expression, since it has been reported that these hormones can activate them in a ligand-independent manner.

In *Paper III*, the hypothesis that undernutrition affected the gene expression of the reproductive tract was confirmed, since a lesser expression of ER α transcripts was found on day 5, and of PR transcript on days 5 and 14, in the oviducts ipsilateral to the corpus luteum. Together with the results of Papers I and II, these results reinforced the concept of undernutrition altering the maternal environment for a possible embryo, and could explain at least in part the retarded embryo development observed in undernourished ewes. However, they did not explain why undernourished ewes presented viable embryos on day 8 and 9, but had been reported to have lesser pregnancy rates on days 14 and 15. To test the hypothesis that undernutrition could affect the mechanisms implied in the maternal recognition

of pregnancy, the effect of undernutrition on the endometrial expression of PR, ER α , oxytocin receptor, interferon tau receptor and cyclooxygenase-2 was investigated in pregnant ewes. In *Paper IV*, this hypothesis was not confirmed since no effect of undernutrition on the mechanisms of maternal recognition of pregnancy was observed in pregnant ewes. From the results of this thesis, could be speculated that an altered gene expression in the reproductive tract of undernourished ewes on day 5 could be the cause of the retarded development of embryos previously reported for undernourished ewes.

A David.

AGRADECIMIENTOS

Nunca se te concede un sueño sin concederte también la posibilidad de hacerlo realidad. Sin embargo, es posible que te cueste trabajo...

Richard Bach

Yo soñé, y salí tras ese sueño...verlo hecho realidad es reconfortante, pero el camino de búsqueda y las personas con las que me he cruzado, lo convierten en especial y memorable. Esta tesis es, en gran medida, el resultado de un trabajo de equipo y de aportes individuales de muchas personas. A todas ellas va mi profundo agradecimiento:

A **Alfonso Abecia**, mi tutor, mi más sincero agradecimiento por las horas de trabajo compartidas sin que pareciera trabajo, por su enorme calidad humana y por estar siempre presente para mí... trabajar a su lado ha sido un privilegio. De nuevo a él y a **Fernando Forcada**, por brindarme la oportunidad de venir a Zaragoza aquella primera vez y por su apoyo, su generosidad y su confianza durante el transcurso de esta tesis. A **Ana Meikle**, mi otra tutora. A través de sus ojos me asomé a la ciencia y ya no pude dejar de mirar. Mi eterno agradecimiento por su confianza en mí, por su inagotable entusiasmo y generosidad, por sus enseñanzas, por velar siempre por mi formación, por las interminables horas de trabajo, por su gran humanidad y por su amistad.

A mis compañeros del Departamento de Producción Animal, de la Facultad de Veterinaria (F.V), Zaragoza. Mis eternas gracias, **Jose Antonio Valares**, por haber sido un excelente anfitrión y compañero de trabajo, por enseñarme a sangrar a las ovejas, por la risa siempre dispuesta...y por tu amistad. A **Inmaculada Palacín** (Macu), por ponerle el hombro a mis experimentos como a los propios y siempre estar dispuesta para ayudar, y por su energía impresionante a la hora de trabajar.

A **Adriana Casao e Isabel Vázquez** por los momentos de trabajo compartido. A las tres, por su gran generosidad; su energía y su amistad durante todo este tiempo han hecho que el período de tesis fuera realmente un placer...¡gracias chicas!

A **José María Lozano**, porque casi sin saberlo, puso la piedra fundamental para esta tesis. Al **personal del Servicio de Experimentación Animal**, F.V., Zaragoza: mi enorme gratitud hacia aquellas personas que se involvieron en mis experimentos y que, en gran medida, los hicieron posibles.

A mis compañeros del Departamento de Bioquímica, F.V., Uruguay, por haber sido mi segundo hogar durante mucho tiempo, por brindarme una formación científica y docente de la que me enorgullezco y por permitirme el espacio para crecer. A **Elsa Garófalo**, por demostrarme su confianza y apoyarme en mis decisiones. A **Celia Tasende**, por introducirme a la técnica de ensayo de unión y dedicarme horas de trabajo en el laboratorio, por su rigor científico y por siempre estar dispuesta para la charla. A **Isabel Sartore**, por su apoyo técnico, por estar disponible para atender cada detalle que necesité desde el otro lado del 'charco', por ser un ejemplo de empuje, optimismo y superación constante. A **Perla Rubianes**, por el apoyo técnico en las determinaciones de laboratorio y su gran corazón. A **Sebastián Acuña, Juan Pablo Damián e Inés Sacchi**, por las labores docentes compartidas y por siempre pensar que las cosas se pueden hacer mejor. A **Andrea Fernández, Inés Bizera y Marilina Talmon**, que han dado sus primeros pasos en la ciencia evaluando muestras de mi tesis.

A **Carolina Viñoles**, por ser incansable y rigurosa en la discusión científica y por sus enseñanzas de estadística. A **Alejandro Bielli**, por su granito de arena para que yo me interesara por la ciencia, y por haber brindado siempre su ayuda, y puesto a disposición las instalaciones del Área de Histología, F.V., Uruguay. A **Gonzalo Uriarte**, de la Dirección de Laboratorios Veterinarios, Uruguay, por haber facilitado el uso del multianalizador para determinar los metabolitos de esta tesis. A **Antonio González de Bulnes**, por su colaboración entusiasta en nuestro tercer experimento. A **Marcelo de las Heras y José Antonio García del Jalón**, del Departamento de Patología, F.V., Zaragoza, por haber brindado su ayuda siempre que la necesité. A **Pepín Cebrián y Teresa Muiño**, por abrirme las puertas del Departamento de Bioquímica, F.V., Zaragoza, y siempre tener una sonrisa o una palabra cariñosa; y a las chicas del laboratorio por contestar mis múltiples preguntas siempre. A **Natalia Guillén**, por haberme ayudado tan desinteresadamente en mis primeros pasos sola en la técnica de PCR en tiempo real.

Durante el transcurso de esta tesis tuve el privilegio de conocer a diferentes científicos; a todos ellos mi agradecimiento por las discusiones científicas, el tiempo dedicado y la formación "no formal" aportada: Maurice Boland (Irlanda), Mats Forsberg (Suecia), Yves Chilliard y Muriel Bonnet (Francia), Graeme Martin (Australia) y Rex Scaramuzzi (Inglaterra).

Al equipo de la **Sección de Relaciones Internacionales**, de la Universidad de Zaragoza, por recibirnos cada mes con una sonrisa, por su eficiencia y por interesarse por nosotros, los becarios extranjeros. A **Inmaculada Foncillas**,

Secretaria del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, F.V, Zaragoza, por atender siempre a mis preguntas, por su eficiencia y por su simpatía.

¿Qué sería de mí sin mis amores?...

Agradezco a **mi familia** el estar siempre a mi lado, alentándome a cada paso, festejando los logros y acompañando en los momentos malos, aún con la distancia de por medio...su amor y su apoyo me abrigan el corazón. A **mis padres**, los mejores, a los que debo todo y a los que agradezco su amor incondicional, los valores y la educación recibida: será siempre mi mejor herencia. A **mi hermano Diego**, por su chispa constante, por haber sabido emocionarse con mis éxitos y por estar siempre al otro lado para solucionar mis problemas informáticos. A **mis nonos**, por toda una vida de enseñanzas, sería imposible imaginar unos abuelos mejores, ilos llevaré en mi corazón siempre! A **la familia de David**, por abrirme las puertas de su hogar. A todos **mis amigos**: a los de España, por tantos momentos buenos que vivimos durante esta etapa; a mis amigos de Uruguay, por haberme acompañado en este camino desde la distancia, su amistad es un regalo que atesoro y que llevo conmigo a donde vaya...igracias gurises!

A **David**, por apoyarme durante todo el transcurso de mi tesis, por alentarme siempre en mis ansias de crecer, por caminar a mi lado, y por su amor...

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	7
SUMMARY	9
AGRADECIMIENTOS.....	13
TABLA DE CONTENIDOS.....	17
APÉNDICE Y ANEXOS.....	19
ABREVIATURAS	20
INTRODUCCIÓN.....	21
Eficiencia reproductiva y factores que la afectan.....	21
El ciclo sexual ovino	21
Mecanismo de acción hormonal	22
Receptores de progesterona y estrógenos	22
Receptor de oxitocina	25
Gestación temprana.....	26
Oviductos y útero	26
Mecanismo luteolítico y reconocimiento materno de la gestación.....	29
Mecanismo luteolítico.....	30
Reconocimiento materno de la gestación	30
Nutrición y reproducción	33
Efectos sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario	35
Efectos sobre las concentraciones de progesterona.....	36
Efectos sobre el desarrollo embrionario y el ambiente uterino	37
Mediadores entre el estado metabólico y el sistema reproductivo	37
HIPÓTESIS Y ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN.....	40
METODOLOGÍA	44
Diseños experimentales	45
Aspectos generales.....	45
Experimento 1 (Artículo I)	46
Experimento 2 (Artículos II y III)	47
Experimento 3 (Artículo IV)	48
Determinaciones en plasma.....	48
Metabolitos.....	48
Hormonas	48
Determinaciones en el tracto reproductivo.....	49
Trascriptos de los receptores esteroideos (Artículos II y III)	49

Capacidad de unión de los receptores esteroideos (Artículo II).....	49
Abundancia y localización tisular de proteínas (Artículos I, II y IV)	50
Concentración endometrial de progesterona (Artículo IV)	51
Secreción in vitro de PGF ₂ α y PGE ₂ endometriales (Artículo IV)	52
Análisis estadístico	52
 RESULTADOS	53
Respuesta metabólica al tratamiento nutricional.....	53
Efecto de la subnutrición sobre las concentraciones de 17β-estradiol y progesterona en plasma y endometrio.....	56
Efecto de la subnutrición sobre la sensibilidad del tracto reproductivo a los estrógenos y a la progesterona en ovejas cíclicas	57
Efecto de la subnutrición y de la gestación sobre factores asociados al reconocimiento materno de la gestación (Artículo IV)	60
Efecto de la subnutrición	60
Efecto de la gestación	60
Efecto del día del ciclo estral y del tipo celular sobre el contenido endometrial de receptores de estrógenos y progesterona	62
Efecto del día del ciclo estral.....	62
Efecto del tipo celular	62
 DISCUSIÓN.....	64
Respuesta metabólica al tratamiento nutricional.....	65
Efecto de la subnutrición y de la gestación sobre las concentraciones plasmáticas de 17β-estradiol y progesterona	67
Efectos sobre la sensibilidad del tracto reproductivo a los estrógenos y la progesterona	68
Efecto de la subnutrición	68
Efecto del día del ciclo sexual.....	70
Efecto del tipo celular	71
Efecto de la subnutrición sobre el reconocimiento materno de la gestación	72
 CONCLUSIONES	75
CONSIDERACIONES FINALES.....	76
 REFERENCIAS	79
APÉNDICE.....	81

APÉNDICE

Esta tesis se ha basado en los siguientes artículos científicos originales, que se adjuntan al final:

- Artículo I.** Effect of plane of nutrition on endometrial sex steroid receptor expression in ewes. *Animal Reproduction Science*, 2004: 84(3-4), 337-348.
- Artículo II.** Effect of undernutrition on uterine progesterone and oestrogen receptors and on endocrine profiles during the ovine oestrous cycle. *Reproduction, Fertility and Development*, 2006: 18, 447-458.
- Artículo III.** Undernutrition reduces the oviductal mRNA expression of progesterone and oestrogen receptors in sheep. *The Veterinary Journal*, in press, doi:10.1016/j.tvjl.2007.01.018.
- Artículo IV.** Effect of undernutrition on the maternal recognition of pregnancy in sheep (*En preparación*).

ANEXOS

Otros trabajos con los que esta tesis ha contribuido

Review: Meikle A., Tasende C., **Sosa C.**, Garfallo G. The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. *Reproduction, Fertility and Development*, 2004: 16, 385-394.

Review: Abecia J.A., **Sosa C.**, Forcada F. and Meikle A. The effect of undernutrition on the establishment of pregnancy in the ewe. *Reproduction, Nutrition and Development*, 2006: 46, 367-378.

ABREVIATURAS

AGNE	Ácidos grasos no esterificados
AST	Aspartato amino transferasa
CC	Condición corporal
cDNA	Ácido desoxi-ribonucleico complementario
CL	Cuerpo lúteo
COX	Ciclooxygenasa
DAB	3,3'-diaminobencidina
DAG	Diacilglicerol
E	Estrógenos
E2	17 β -Estradiol
eCG	Gonadotropina coriónica equina
ER	Receptor de estrógenos
ERE	Elemento de respuesta a esteroides
FSH	Hormona folículo-estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GPCR	Receptores unidos a proteínas G
IFN	Interferón
IFNAR	Receptor de IFN α
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IGFBP	Proteína de unión al IGF
IGF-IR	Receptor de IGF tipo I
IP3	Inositol trifosfato
IRE	Elemento de respuesta al IFN
IRF	Factor regulador de IFN
ISFG	Factor regulador de los genes estimulados por IFN
ISG	Genes estimulados por el IFN
JAK	Janus kinasa
Kd	Constante de disociación
LH	Hormona luteinizante
MJ	Megajoules
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
Ob-R	Receptor de leptina
ORG	Organon (P4 sintética)
oTP	Proteína trofoblástica ovina
OTR	Receptor de oxitocina
P4	Progesterona
PBS	Solución fosfato salina
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PG	Prostaglandina
PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato
PKC	Proteína kinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PR	Receptor de progesterona
PV	Peso vivo
RIA	Radioinmunoanálisis
STAT	Traductores de señal y activadores de la transcripción
TNA	Ácidos nucleicos totales
Tyk-2	Tirosina kinasa 2

INTRODUCCIÓN

Eficiencia reproductiva y factores que la afectan

La eficiencia reproductiva, definida como el número de descendientes viables producidos anualmente por cada hembra destinada a la reproducción, es uno de los factores más importantes que determina la eficiencia productiva y económica en los sistemas de explotación ovina (Azzarini, 2002). La nutrición, el fotoperiodo y el estrés ejercen efectos profundos sobre la actividad reproductiva (Martin, 1995). En la especie ovina, hasta un 40% de las ovulaciones no se corresponden con embriones viables el día 12 de gestación (Ashworth, 1995; Kleemann y Walker, 2005). La mayor causa de mortalidad embrionaria en la etapa de pre-implantación se debe a problemas en la señalización entre el embrión y la madre, lo que conduce a un desarrollo asincrónico, con retraso en el crecimiento del embrión (Goff, 2002). Las causas de mortalidad embrionaria son diversas y pueden tener origen en el embrión, el ambiente uterino o ambos a la vez. Factores como el estrés, el calor, la nutrición, afecciones uterinas, incluso anomalías cromosómicas de los embriones en un muy pequeño porcentaje, pueden actuar en detrimento de un buen diálogo entre la madre y el embrión (Goff, 2002). El estado nutricional del animal es uno de los factores más importantes afectando la función reproductiva en la hembra, ya que sus acciones pueden ser ejercidas en todos los niveles de control reproductivo (hipotálamo, hipófisis, ovarios, útero y embrión).

El ciclo sexual ovino

La función reproductiva en la oveja está dominada por dos ritmos diferentes: uno anual, que determina que la oveja sea activa desde el punto de vista reproductivo durante los días cortos (estación reproductiva) y otro que se da durante la estación reproductiva en forma de ciclos sexuales de 16 o 17 días. Los ciclos sexuales, también llamados estrales, ocurren en base a una secuencia de acontecimientos endocrinos en los que participan varios órganos y las hormonas por ellos secretadas: el hipotálamo, con la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH); la hipófisis, con la hormona luteinizante (LH) y la folículo-estimulante (FSH); los ovarios, secretando los estrógenos (E) y la inhibina en los folículos y la progesterona (P4) y la oxitocina en el cuerpo lúteo (CL); y el útero, liberando prostaglandina (PG) F2a (Goodman, 1994). La GnRH hipotalámica estimula el aumento de LH hipofisaria, la cual induce al crecimiento del folículo ovulatorio

productor de E que permite la ovulación y la formación del CL. La P4 producida por el CL se mantiene elevada durante 12-14 días determinando la fase luteal. El predominio de la P4 hace que al cabo de esa fase se establezca un mecanismo de retroalimentación positivo en el cual la oxitocina hipofisiaria y luteal favorece el aumento de la secreción pulsátil de PGF2 α endometrial, lo cual desencadena la regresión del CL o luteólisis en los días 14 a 16 del ciclo sexual, con la subsiguiente caída en las concentraciones de P4. En este momento comienza nuevamente el predominio estrogénico durante 2-3 días, determinando la fase folicular del ciclo sexual. De esta manera, la oveja retorna al celo (o estro) completando su ciclo sexual de 17 días (Goodman, 1994).

Mecanismo de acción hormonal

Las hormonas producidas por los diferentes órganos son secretadas al torrente sanguíneo, donde se distribuyen a todos los tejidos. A pesar de que las hormonas llegan a todo el organismo, sólo algunos tejidos tienen la capacidad de responder a ellas; éstos son los tejidos diana. Esta especificidad tisular se debe a que las hormonas se unen a receptores específicos ubicados en las células de los tejidos diana. Las proteínas receptoras se unen a la hormona (ligando) con alta afinidad (en el rango de las concentraciones circulantes de hormona), tienen una capacidad de unión limitada (es decir, son saturables), y su interacción con la hormona induce una respuesta biológica en los tejidos sensibles. Sin embargo, el mecanismo de señalización hormonal dentro de la célula es diferente dependiendo de la naturaleza química de las hormonas.

Receptores de progesterona y estrógenos

La P4 y los E son hormonas esteroideas sintetizadas por el ovario a partir de colesterol (Niswender y Nett, 1994). Debido a su naturaleza lipídica, entran a las células por difusión, y se unen a receptores específicos (proteínas) de localización nuclear. Los receptores de P4 y E (PR y ER, respectivamente) así como el resto de los receptores de hormonas esteroideas, forman parte de una gran familia de factores de transcripción activados por el ligando y comparten características estructurales. Los receptores esteroideos son macromoléculas, proteínas, que se encuentran en el núcleo de la célula y que tienen sitios o dominios específicos de unión a las hormonas y dominios de unión al DNA que interactúan con secuencias específicas de éste (elementos de respuesta a esteroides, ERE) (Tsai y O'Malley, 1994). Un modelo simplificado de la acción "clásica" de las hormonas esteroideas

en la célula (tomando como ejemplo a la P4) se presenta en la Figura 1A. La unión de la hormona esteroidea 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 los ERE activando genes y estimulando su transcripción para producir RNA mensajeros (mRNA). Los mRNA son traducidos en los ribosomas citoplásmicos produciendo proteínas que influyen en la función celular. En algunos casos la interacción del receptor con los genes puede ser represiva. 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). Se ha descrito que esta acción del receptor nuclear como factor de transcripción (acción genómica) también puede ser causada en ausencia del ligando, por otras moléculas, por ejemplo, factores de crecimiento o neurotransmisores capaces de activar a los receptores (Auger, 2001; Flint y col., 2002).

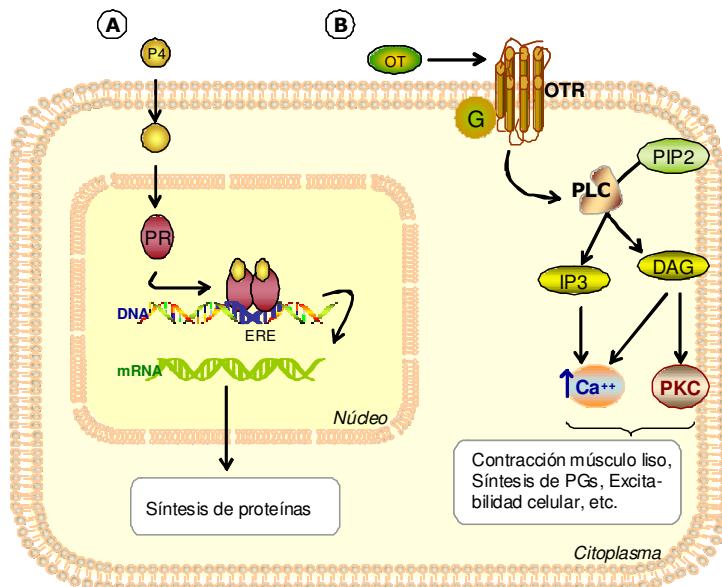


Figura 1. Representación esquemática del mecanismo de acción de (A) las hormonas esteroideas (progesterona/estrógenos), y (B) de la oxitocina en la célula. Ver explicación en el texto. P4: progesterona, PR: receptor de progesterona, ERE: elemento de respuesta a esteroides, OT: oxitocina, OTR: receptor de oxitocina, G: proteínas G, PLC: fosfolipasa C, PIP2: fosfatidilinositol bifosfato, DAG: diacilglicerol, IP3: inositol trifosfato, PKC: proteína quinasa C.

Además de este mecanismo de acción a nivel genómico ("clásico"), existe un mecanismo de acción no genómica por unión de las hormonas esteroideas a receptores ubicados en la membrana celular y desencadenamiento de cascadas de segundos mensajeros (Revelli y *col.*, 1998; Dunlap y Stormshak, 2004; Nadal y *col.*, 2004; Ashley y *col.*, 2006). Las acciones no genómicas son rápidas, inmediatas, mientras que las acciones genómicas tardan minutos, horas o días. Sin embargo, las funciones fisiológicas de los receptores de membrana todavía no se conocen con exactitud.

Existen dos tipos de ER, productos de dos genes diferentes. El ER α es el receptor clásico y predominante en el tracto reproductivo (Meikle y *col.*, 2004). Además, existe otro tipo de ER descubierto en ovario de rata, el ER β , predominante en el ovario (Kuiper y *col.*, 1996). 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. Sólo hemos encontrado un estudio que observa ER β en útero de corderas (Morrison y *col.*, 2003). Por otro lado, al menos dos isoformas del PR han sido descritas en ratas: A y B (Conneely y *col.*, 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. Sin embargo, se ha sugerido en base a estudios en útero de rata, que el PR-A es responsable de la acción anti-estrogénica de la P4 mientras que el PR-B interviene en su efecto proliferativo (Conneely y *col.*, 2001). El PR-B tiene una secuencia de aminoácidos adicional en el extremo N-terminal (Conneely y *col.*, 2001). Las isoformas A y B del PR también han sido demostradas en el endometrio de cerdas (Geisert y *col.*, 1994), pero no hemos encontrado trabajos que las describan en ovinos.

La acción de una hormona en el tejido está mediada por interacciones con su receptor a nivel celular (Clark y *col.*, 1992), por lo tanto, la respuesta celular a la hormona (o sensibilidad) está dada en parte por la concentración de receptores específicos en dicho tejido. La modulación de la concentración de estas proteínas constituye el paso más probable en el control de las respuestas celulares (Clark y Mani, 1994). Las hormonas esteroideas ováricas son importantes moduladores de sus propios receptores, ya que los complejos hormona-receptor son factores de transcripción que pueden activar o reprimir genes incluyendo los genes de PR y ER. La concentración de los receptores esteroideos en el tracto reproductivo de la hembra ha sido estudiada clásicamente en el útero y está demostrado que varía a lo largo del ciclo estral de la oveja (Miller y *col.*, 1977). El 17 β -estradiol (E2), el más importante de los E debido a su potencia biológica, estimula la síntesis de su propio receptor así como también la del PR, mientras que la P4 provoca la regulación a la baja o *downregulation* de ambos receptores (Clark y Mani, 1994).

De esta manera, la concentración uterina de los PR y ER presenta valores máximos alrededor del celo como respuesta a la acción estimuladora de los E y mínimos durante la fase luteal tardía debido a la acción inhibitoria de la P4 (Miller y col., 1977).

Receptor de oxitocina

La oxitocina es un péptido y como tal, es insoluble en la membrana celular lipídica. Las hormonas peptídicas se unen a receptores ubicados en la membrana celular. El receptor de oxitocina (OTR) 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). Parte de esta familia son también los receptores de GnRH, LH, FSH, PGs, etc. Estos receptores se unen a una proteína G tras unirse al ligando y desencadenan múltiples y complejas cascadas de segundos mensajeros (Figura 1B). La mayoría de las acciones del receptor están mediadas por la fosfolipasa C (PLC), la cual forma inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) a partir de fosfatidilinositol bifosfato (PIP2), los cuales al final aumentan la concentración intracelular de calcio o de la proteína cinasa C (PKC). Ambas vías dan lugar a una variedad de eventos celulares, por ejemplo, aumento de la contracción del músculo liso, aumento de la síntesis de PGs en el endometrio o activación de procesos de transcripción génica y síntesis proteica (Gimpl y Fahrenholz, 2001).

Al igual 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. El OTR puede "desensibilizarse" tras la exposición prolongada al ligando: se separa de la proteína G, sufre endocitosis y es internalizado para ser degradado en los lisosomas o reciclado y enviado nuevamente a la membrana plasmática (Gimpl y Fahrenholz, 2001). Los esteroides ováricos también desempeñan un papel importante en la regulación del OTR uterino. El E2 aumenta la síntesis de OTR, y la P4, mediante la inhibición del ER, la disminuye (Sheldrick y Flick-Smith, 1993; Wathes y Lamming, 1995; McCracken y col., 1999). Por esto, el OTR también sigue un patrón de expresión cíclico a lo largo del ciclo sexual, con altos niveles en el celo (alto E2) y bajos niveles durante la fase luteal media (alta P4).

Gestación temprana

Tras la fertilización, el embrión sufre sus primeras divisiones celulares en el oviducto y alcanza el útero alrededor del día 4 post-celo, como mórula compacta. Hacia el día 6 se forma el blastocisto por compactación de la mórula compacta y entrada de líquido extracelular tras lo cual se forma una cavidad rodeada por células trofoblásticas. El blastocisto, en su forma esférica, eclosiona de la zona pelúcida en los días 8 a 9. Hacia el día 11 va adoptando una forma tubular y luego se elonga convirtiéndose en un embrión filamento entre los días 12 y 16. 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 depende de sus secreciones (Ashworth, 1995; Fleming y col., 2004; Spencer y col., 2004b). La importancia de esta etapa en la supervivencia embrionaria se pone de manifiesto en la alta incidencia de mortalidad embrionaria que ocurre en este momento de la gestación (Roche y col., 1981; Goff, 2002). De hecho, se ha observado que entre un 25 y un 55 % de los todos los embriones mamíferos se pierden durante la gestación temprana (Niswender y Nett, 1994). Una sincronía estricta entre el ambiente materno y el embrión es esencial para asegurar la supervivencia embrionaria: tanto el endometrio como el embrión, sintetizan y secretan a la interfase embrio-maternal una miríada de factores de crecimiento, proteínas, citoquinas, hormonas y otras sustancias que afectan a ambas partes, ya sea en forma autocrina o paracrina, y que determinan dicha sincronía (Martal y col., 1997). Esto se evidencia cuando al transferir embriones a ovejas receptoras que no están en la misma etapa gestacional que las donantes (Wilmut y Sales, 1981) o al cuerno uterino contralateral al CL (Moor y Rowson, 1966a), los embriones sufren desde retraso en su desarrollo hasta la muerte.

El desarrollo de los embriones previo a la implantación puede ser convenientemente dividido en dos fases, temprano y tardío, correspondiendo 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). Se hace necesario conocer entonces el medio en el que se desarrollan los embriones en esta etapa de la gestación.

Oviductos y útero

Los *oviductos* están divididos anatómicamente en tres regiones bien diferenciadas: infundíbulo (adyacente al ovario), ampolla e istmo (adyacente al útero).

Histológicamente, el oviducto está compuesto por la mucosa y la *muscularis*. La mucosa está formada por un epitelio que descansa sobre la *lámina propia*. El epitelio está compuesto por dos tipos de células principales: ciliadas y no ciliadas o secretoras (Fawcett, 1988).

El útero de los rumiantes consta de dos cuernos uterinos, un cuerpo y un cuello o cérvix. En las ovejas el útero es bipartito, es decir, existe un tabique entre ambos cuernos, pero éstos están unidos caudalmente. La mayor parte de la gruesa pared uterina está formada por el músculo liso (*miometrio*), el cual incluye una capa interna circular y una capa externa longitudinal. La luz uterina está tapizada por una mucosa glandular llamada *endometrio*, formado por un *epitelio cilíndrico simple* desde el que se extiende una serie de *glándulas tubulares*, y por el *estroma endometrial* (Fawcett, 1988; Hafez, 1996). El estroma comprende una zona de fibroblastos densamente organizada (*stratum compactum*) adyacente al epitelio luminal, que se extiende hacia una zona más profunda dispuesta de manera más laxa (*stratum spongiosum*), vasos sanguíneos y células inmunes (Gray y col., 2000). 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 embrionarios (Taylor y col., 2000). En los rumiantes, 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).

Si bien se acepta que los embriones en la etapa de pre-implantación son relativamente autónomos, durante la última década se han acumulado numerosas evidencias sobre la participación en esta etapa de muchas hormonas y factores de crecimiento que determinan la viabilidad futura del embrión (Kaye, 1997). Más aún, un ambiente perturbado puede no afectar al embrión inmediatamente, pero comprometer su desarrollo en etapas posteriores (Leese, 2005). Esta puntualización debe ser tenida en cuenta ya que la mortalidad embrionaria en la etapa de pre-implantación tardía (en útero) puede haberse determinado en etapas anteriores (en oviducto).

El tracto reproductivo de los mamíferos sufre cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos durante el ciclo estral, que tienden a establecer un microambiente que es esencial para la maduración final de los gametos, capacitación de los espermatozoides, transporte de los gametos y embriones, fertilización y divisiones tempranas en el desarrollo embrionario (Nancarrow y Hill, 1995; Buhi, 2002). Las

hormonas esteroideas ováricas tienen una función esencial regulando cambios en la estructura y fisiología del tracto reproductivo (Geisert *y col.*, 1992; Buhi *y col.*, 1997). Durante el celo y los primeros días de gestación ocurren alteraciones estructurales (modificaciones en la altura, forma y secreción de las células) a lo largo de todo el oviducto (Murray, 1995). Cuando ovejas ovariectomizadas son tratadas con E2, los organelos secretores de las células secretoras del oviducto se hipertrofian, y este evento es revertido con el posterior tratamiento con P4 (Murray, 1992; Leese *y col.*, 2001). El endometrio también 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 producen un notable crecimiento uterino. Durante la fase folicular, las glándulas crecen, penetran profundamente en el estroma y comienzan a enrollarse, pero su capacidad secretora plena se da bajo la influencia de la P4 (Niswender *y Nett*, 1994). Las glándulas uterinas sufren una marcada hiperplasia e hipertrofia durante la gestación (Gray *y col.*, 2001). El desarrollo y la función del útero dependen de interacciones entre el epitelio y el estroma (Gray *y col.*, 2001). El estroma dirige el desarrollo epitelial, mientras que el epitelio influye en la organización del endometrio y en la diferenciación del miometrio (Cunha *y col.*, 1989; Gray *y col.*, 2001). Esta comunicación entre el epitelio y el estroma es facilitada por vías autocrinas y paracrinas dentro del tejido uterino (Cooke *y col.*, 1998). La P4 actúa en el útero asegurando su quiescencia y 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).

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). En el oviducto, el producto de secreción más abundante es un grupo de glicoproteínas de alto peso molecular, específico del oviducto, aunque también se secretan factores de crecimiento y citoquinas. Las glicoproteínas se unen a la zona pelúcida y a las membranas de los gametos y son esenciales para la capacitación, motilidad y viabilidad espermáticas y para el correcto desarrollo embrionario temprano (Murray *y col.*, 1995; Leese *y col.*, 2001; Buhi, 2002). Se ha demostrado que su secreción está regida por ambas hormonas esteroideas, siendo aumentada por los E y disminuida por la P4 (Murray *y col.*, 1995; Buhi, 2002). Esto asegura una sincronización con la fertilización y el desarrollo temprano del embrión. Los esteroides ováricos también pueden regular la composición de las secreciones, ya que el fluido del oviducto de la fase folicular tiene diferentes efectos sobre la capacidad y motilidad de los espermatozoides y la penetrabilidad de los oocitos,

que el de la fase luteal (Killian, 2004). También están presentes en el fluido del oviducto factores embriotróficos y mitogénicos, como los factores de crecimiento, en cantidades variables (Gandolfi y *col.*, 1989). Potencialmente, estos factores actúan de manera autocrina o paracrina para regular la función del oviducto y/o el desarrollo embrionario (Buhi y *col.*, 1997). Stevenson y *col.* (1996) demostraron que el oviducto ovino sintetiza el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-I) y que éste aumenta en el período peri-ovulatorio.

En cuanto al útero, se han descrito numerosos factores que el endometrio secreta a su luz que son muy importantes para el correcto desarrollo del embrión. El IGF-I, secretado en forma endocrina por el hígado pero también paracrina por el útero, es uno de los principales factores que incrementan el desarrollo embrionario (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. La PGE2, además de sus funciones en procesos inflamatorios, ha sido relacionada con la receptividad uterina, la quiescencia del miometrio y un efecto antiluteolítico o luteoprotector (Arosh y *col.*, 2004). De hecho, se ha demostrado que los productos de secreción del embrión estimulan la síntesis endometrial de esta PG (Asselin y *col.*, 1997b). La osteopontina y la proteína de la leche uterina también han sido identificadas como componentes de las secreciones endometriales importantes durante la gestación temprana (Johnson y *col.*, 1999; Spencer y *col.*, 2004a). La composición del fluido uterino es compleja y aún se está dilucidando, pero lo que parece ser más importante para el correcto desarrollo del embrión es que éste sea sincrónico con la etapa de la gestación en que el útero se encuentre.

Dada la enorme importancia de la P4 en la fisiología uterina, uno de los principales desafíos del embrión previo a su implantación es asegurar que la producción de P4 por el CL no se interrumpa.

Mecanismo luteolítico y reconocimiento materno de la gestación

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 CL, impidiendo el mecanismo luteolítico que se desarrolla entre el endometrio y el ovario. Para comprender los mecanismos por los cuales el embrión evita la destrucción del CL es necesario conocer previamente las bases moleculares del mecanismo luteolítico.

Mecanismo luteolítico

La participación del endometrio en el mecanismo luteolítico ocurre en el epitelio luminal y en las glándulas superficiales y requiere los efectos secuenciales de la P4, los E y la oxitocina actuando a través de sus respectivos receptores (Spencer y col., 2004a). Durante la fase folicular los E estimulan la síntesis de estos receptores y durante la fase luteal la P4 actúa suprimiendo la síntesis de ER y OTR. Sin embargo, la exposición prolongada (de 8 a 10 días) a altos niveles de P4, inhibe la expresión del propio PR, y termina el bloqueo sobre ER y OTR, que aumentan rápidamente. La oxitocina es capaz de inducir, entonces, la liberación de pulsos luteolíticos de PGF2 α endometrial los días 14 a 16 del ciclo sexual y el CL regresa (Spencer y col., 2004a).

La síntesis de todas las PGs (y también de las prostaciclinas y los tromboxanos) tiene un paso común y obligatorio: la conversión de ácido araquidónico a PGH2 por la prostaglandina-endoperóxido H sintasa, también llamada ciclooxygenasa (COX). La COX existe en dos isoformas: la COX-1 se expresa constitutivamente en los tejidos, y la COX-2, que puede ser inducida y no es constitutiva y desempeña funciones en varias condiciones fisiológicas y patológicas de los tejidos animales. Ambas son proteínas integrales de las membranas celulares y del retículo endoplásmico, aunque COX-2 también se ha localizado en la membrana nuclear (Smith y col., 1996; Goff, 2004). Ambas isoformas se expresan en el útero ovino, pero mientras la COX-1 no presenta variaciones en su expresión, la COX-2 muestra cambios importantes durante el ciclo sexual y la gestación, sugiriendo un papel esencial en estos acontecimientos (Charpigny y col., 1997).

La oxitocina estimula la síntesis de PGF2 α endometrial actuando a través del OTR (McCracken y col., 1999). En cultivos de células endometriales bovinas, la oxitocina estimula la síntesis del mRNA de COX-2, pero no el de COX-1, y la adición de un inhibidor específico de COX-2 al cultivo, disminuye el aumento de PGF2 α inducido por la oxitocina (Asselin y col., 1997a). En un experimento *in vivo* en el que se trató a ovejas con oxitocina, ésta estimuló la síntesis del mRNA de COX-2 con un aumento concomitante de la PGF2 α endometrial (Burns y col., 1997).

Reconocimiento materno de la gestación

El proceso 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).

Los experimentos pioneros de Moor y Rowson en la década de los 60 (1966c; 1966b; 1967; 1969) demostraron 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. Casi dos décadas más tarde, Godkin *y col.* (1982) purificaron la proteína responsable de bloquear el mecanismo luteolítico, la proteína trofoblástica ovina (oTP). En los años siguientes se demostró que esta proteína tenía actividades antivirales, antiproliferativas e inmunosupresoras, actividad compartida con los interferones (IFN), y que presentaba una gran homología con la secuencia del interferón α , por lo que se la clasificó dentro de la familia de los interferones tipo I (Imakawa *y col.*, 1987; Roberts, 1989). Posteriormente fue denominado interferón tau (IFNT), una nomenclatura conveniente para denominar al interferón trofoblástico (Roberts *y col.*, 1992). En el estudio donde se analizó la síntesis de IFNT más tempranamente en la gestación (desde el día 6), Ashworth y Bazer (1989) encontraron que el medio de cultivo de los embriones de día 8 ya contenía niveles apreciables de la proteína (medidas por radioinmunoanálisis). Resulta aparentemente contradictorio que estos autores en sus subsiguientes trabajos (Ashworth, 1995; Spencer *y col.*, 2004a) refieran el comienzo de la síntesis de IFNT desde el día 10 de la gestación. Otros autores encontraron que las células trofoblásticas expresan el mRNA de IFNT el día 10, pero no analizaron días anteriores (Farin *y col.*, 1990). Sí hay consenso en que el IFNT es sintetizado hasta el día 21, presentando máximas concentraciones el día 14 de la gestación (Godkin *y col.*, 1982; Hansen *y col.*, 1988; Spencer *y col.*, 2004a). La mayor producción de IFNT 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 IFNT, ya que su mRNA 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). Es decir, el tamaño del embrión es importante para evitar la luteólisis; embriones pequeños no producirán suficiente IFNT.

Los interferones de tipo I, de los cuales el IFNT forma parte, actúan a través del receptor de IFN- α o IFNAR, localizado en la membrana (Langer y Pestka, 1988). El IFNAR está compuesto por dos subunidades, IFNAR1 e IFNAR2, ambas necesarias para la unión al ligando y la señalización intracelular (Domanski y Colamonici, 1996). Un esquema de la vía de señalización intracelular de este receptor se

presenta en la Figura 2. La unión del IFNT a su receptor endometrial activa a las Janus kinasas (JAK) y tirosina kinasas (Tyk), las cuales fosforilan a traductores de señal y activadores de la transcripción (STAT) 1, 1A y 2. Estas proteínas fosforiladas se unen a un factor regulador de IFN (IRF) formando un complejo (ISGF3) que es transportado al núcleo donde se une a elementos de respuesta al IFN (IRE) en genes sensibles al IFN (ISG), modulando su transcripción (Bazer y col., 1997; Demmers y col., 2001). Aunque parecen existir vías de señalización alternativas para este receptor, el mecanismo aquí descrito es el mecanismo clásico de acción de IFN (Mogensen y col., 1999). La acción del IFNT en la célula está modulada por los IRF. Los más conocidos son el IRF-1 y el IRF-2. El IRF-1 es un activador de la transcripción mientras que el IRF-2 es su represor antagonista y sólo se expresa en las células después de que se haya expresado el IRF-1, ya que es activado por éste (Harada y col., 1994).

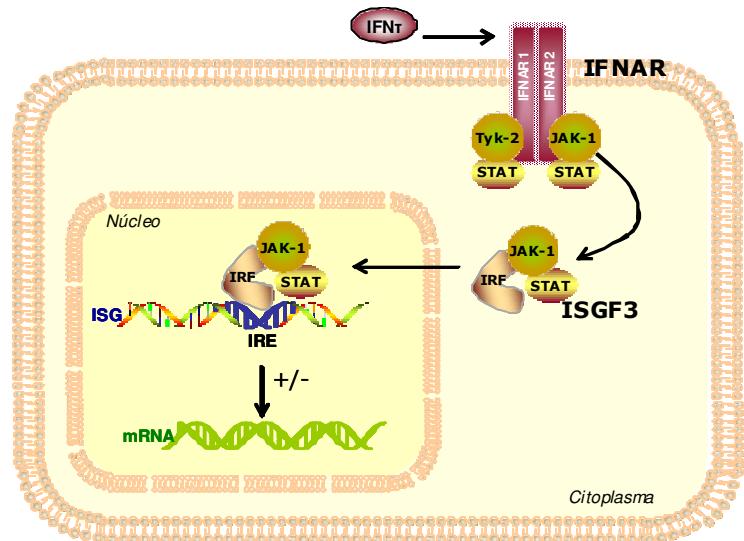


Figura 2. Representación esquemática del mecanismo de acción del IFNT en la célula. Ver explicación en el texto. IFNAR: receptor de IFNa; JAK-1: Janus kinasa 1; Tyk-2: tirosina kinasa 2; STAT: Traductores de señal y activadores de la transcripción; IRF: factor regulador de IFN; ISGF3: factor regulador de los ISG; ISG: genes estimulados por el IFN; IRE: elemento de respuesta a IFN.

La teoría más actual sobre las bases moleculares del mecanismo de reconocimiento materno de la gestación es que el IFNT sintetizado por el trofoblasto, actuando a través del IFNAR, actúa en forma paracrina sobre los epitelios luminal y glandular endometriales para evitar la transcripción del gen de OTR (ya sea directa o indirectamente inhibiendo primero la síntesis del ER α) suprimiendo de esta manera

el desarrollo del mecanismo luteolítico en el endometrio. El IFN τ es capaz de regular la transcripción del ER α y OTR, ya que en estos genes existen elementos de respuesta al IFN (Spencer y Bazer, 1996; Bathgate y col., 1998). Esta acción podría estar mediada por la activación del IRF-2, que actúa como supresor de la transcripción de diferentes genes (Spencer y col., 1998). Al inhibir el aumento en la expresión de OTR, el embrión evita en última instancia la producción de pulsos luteolíticos de PGF2 α , con lo cual mantiene el CL y asegura un ambiente uterino propicio para su desarrollo (Spencer y col., 2004a). Además, utilizando cultivos de células endometriales bovinas se ha demostrado que el IFN τ disminuye la síntesis de PGF2 α y del mRNA de COX-2 y de la PGF sintasa, que son estimuladas por la oxitocina, y disminuye la capacidad de unión de los OTR (Asselin y col., 1997a; Xiao y col., 1998; 1999).

Por otro lado, hay evidencia de que el embrión podría actuar también a nivel ovárico, impidiendo la acción de la PGF2 α , ya que cuando se extraen proteínas (diferentes de IFN τ) de embriones ovinos de 15-17 días se produce un bloqueo sobre los efectos inhibitorios de la PGF2 α sobre la producción de progesterona, en células luteales *in vitro* (Wiltbank y col., 1992). Sin embargo, no se han encontrado trabajos que profundicen o coincidan con esta cita.

Desde que comienza la síntesis de IFN τ hasta el día 14, momento en que se desencadenaría la luteólisis, el embrión debe ser capaz de suprimir el mecanismo luteolítico para asegurar su supervivencia. Cualquier acontecimiento que interfiera con el proceso de reconocimiento materno de la gestación, podría resultar en la muerte embrionaria. Como se mencionó anteriormente, la nutrición es uno de los factores más importantes que afectan la eficiencia en la reproducción. Es necesario entonces, conocer de qué manera la subnutrición puede afectar la función reproductiva.

Nutrición y reproducción

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). Las diferentes aproximaciones al estudio de la relación entre la nutrición y la reproducción (diferencias en el ambiente, edad y raza de los animales, composición de las dietas, duración de los tratamientos nutricionales y el momento de su implementación con respecto al ciclo sexual) hacen que los múltiples resultados publicados a veces parezcan contradictorios y que su comparación e interpretación sea difícil. En ovinos, uno de los aspectos más estudiados quizá sea 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).

Una forma de conocer el estado de las reservas corporales de un animal es a través de la evaluación de su peso vivo (PV) y de su condición corporal (CC). La CC se determina evaluando manualmente el grado de cobertura grasa del proceso espinal y las apófisis transversas de las vértebras lumbares, asignando a cada estado un valor (Russel y col., 1969). 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 su estado de reservas corporales es muy conveniente.

Los efectos de la nutrición sobre las variables reproductivas pueden ser "agudos" cuando no están reflejados por cambios en el PV; "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 y col., 1998; Scaramuzzi y col., 2006).

Efectos sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario

Una privación nutricional puede inducir el anestro en ovejas cíclicas y prolongarlo en el postparto (Schillo, 1992; Boland *y col.*, 2001). También se ha demostrado que puede retrasar la pubertad tanto en corderas como en terneras (Foster y Olster, 1985; Adam *y col.*, 1998; Diskin *y col.*, 2003) probablemente impidiendo el incremento prepuberal en la frecuencia de los pulsos de LH (Schillo, 1992; Butler, 2003). En un experimento en el que se aplicó una subnutrición a largo plazo (20 semanas) se observó que las ovejas subnutridas presentaban una disminución en las concentraciones de FSH y LH y una disminución en la frecuencia de los pulsos de LH (Thomas *y col.*, 1990). Este efecto de la subnutrición sobre la LH también se ha observado en períodos más cortos de subnutrición (3 semanas) (O'Callaghan *y col.*, 2000b). Ovejas mantenidas en una CC baja presentaron mayores niveles plasmáticos de FSH que aquellas con una CC alta (McNeilly *y col.*, 1987). Sin embargo, estos investigadores observaron concentraciones de FSH y LH similares cuando a ovejas de CC similar se les administró un plano nutricional alto o bajo (Rhind *y col.*, 1989a), reflejando las diferencias entre los efectos estático y dinámico de la subnutrición. Corderas subnutridas presentaron una baja frecuencia de las descargas episódicas de LH y FSH (aunque esta última, menos drástica) pero ese efecto fue revertido cuando se les administró GnRH, sugiriendo que la deficiencia en las gonadotropinas causada por la subnutrición se debía a una deficiencia en la liberación de GnRH endógena (Foster *y col.*, 1989).

En algunos trabajos se ha encontrado una menor tasa de ovulación en ovejas con una CC baja o subnutridas (McNeilly *y col.*, 1987; Rhind *y col.*, 1989c), mientras que en otros no se han encontrado diferencias en este parámetro (Lozano *y col.*, 2003; Peura *y col.*, 2003; Kakar *y col.*, 2005). Se ha demostrado que las ovejas subnutridas tienen un menor número de folículos grandes (≥ 3 mm) que sus controles (McNeilly *y col.*, 1987), aunque en otro trabajo esa diferencia se observó en ovejas superovuladas pero no en las no estimuladas (O'Callaghan *y col.*, 2000b). Viñoles *y col.* (2002) encontraron que la CC afecta los patrones de la dinámica folicular: ovejas con una CC alta mostraron más ondas foliculares en el período inter-ovulatorio y tuvieron más folículos antrales pequeños que ovejas con una CC baja. Cuando se estudió el efecto de la subnutrición sobre el número de folículos estrogénicos (los que secretan >500 pg de E2 por hora), no se encontró diferencia entre ovejas subnutridas y controles (Abecia *y col.*, 1995; Abecia *y col.*, 1997). Se ha descrito que la calidad de los ovocitos (en cuanto a su morfología) de ovejas subnutridas es similar (O'Callaghan *y col.*, 2000b; Boland *y col.*, 2001), o inferior a las controles (Lozano *y col.*, 2003). También se ha observado que los ovocitos de animales subnutridos tienen una menor tasa de fertilización que los obtenidos de

ovejas alimentadas según sus requerimientos diarios de mantenimiento (O'Callaghan *y col.*, 2000a; Lozano *y col.*, 2003).

Efectos sobre las concentraciones de progesterona

Es consistente en la literatura que en ovinos, las concentraciones plasmáticas de P4 están inversamente relacionadas con el nivel nutricional (Williams y Cumming, 1982; Parr *y col.*, 1987; Rhind *y col.*, 1989b; Lozano *y col.*, 1998; O'Callaghan *y col.*, 2000b). Sin embargo, la producción *in vitro* de P4 por el CL no se ha visto afectada por la subnutrición (Abecia *y col.*, 1995; 1997; 1999b) por lo que los mayores niveles plasmáticos de P4 no se explicarían por una mayor síntesis. Parr (1992) propuso que este fenómeno se debía a una mayor metabolización hepática de la hormona 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, llevará aparejado una liberación del esteroide almacenado (Boland *y col.*, 2001).

Mientras que no se encontró un efecto de una mayor concentración plasmática de P4 sobre la calidad de los oocitos en ovejas sobrealimentadas (Parr *y col.*, 1987; O'Callaghan *y col.*, 2000b), en ovejas subnutridas se la ha asociado con mayores niveles de pérdidas embrionarias (Brien *y col.*, 1981). 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 suficiente como reflejo de la situación en el tracto reproductivo, y que deberían medirse las concentraciones de la hormona a nivel local (Rhind *y col.*, 1989c). De hecho, como la P4 de la vena ovárica puede pasar a la arteria uterina por un mecanismo contracorriente (Einer-Jensen y McCracken, 1981), la llegada de la hormona al útero puede no estar reflejada por sus concentraciones circulantes. En este sentido, se ha observado que ovejas subnutridas tienen similares niveles de P4 en la vena ovárica y en la arteria uterina que ovejas controles en los días 5 y 10 del ciclo sexual o en el día 8 de la gestación (Abecia *y col.*, 1997; Lozano *y col.*, 1998). Las concentraciones similares de P4 en la vena ovárica y en la arteria uterina en ovejas subnutridas y controles, apoyan la teoría de una menor metabolización hepática en ovejas subnutridas. A pesar de que se encontraron niveles plasmáticos de P4 mayores, Lozano *y col.* (1998) observaron que ovejas subnutridas tenían menores concentraciones de P4 en el tejido endometrial que las ovejas controles el día 5 del ciclo sexual. Como se ha discutido anteriormente, la P4 tiene un papel fundamental preparando al útero para una posible gestación, por lo que los autores sugirieron

que los menores contenidos de P4 endometrial podrían estar relacionados con el retraso en el desarrollo de los embriones y las menores tasas de gestación que se han observado en ovejas subnutridas. Al momento de realizar esta tesis no se conocía una explicación para los menores contenidos de P4 endometrial de las ovejas subnutridas respecto a las ovejas control.

Efectos sobre el desarrollo embrionario y el ambiente uterino

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). Abecia *y col.* (1995; 1997; 1999b) no encontraron diferencias en las tasas de gestación debidas a la subnutrición en los días 8 y 9, pero si en los días 14 y 15 de gestación.

Existen evidencias preliminares sobre el efecto de la subnutrición sobre la secreción *in vitro* de IFN τ por los embriones y de PGF2 α por el útero (Abecia *y col.*, 1999a): embriones recuperados el día 15 de la gestación de ovejas alimentadas a la mitad de sus requerimientos para el mantenimiento secretaron menores concentraciones de IFN τ y mayores concentraciones de PGF2 α que las ovejas controles. Estos hallazgos fueron acompañados por una reducción en la supervivencia embrionaria, por lo que se concluyó que la menor tasa de gestación observada en las ovejas subnutridas podría ser mediada por señales alteradas del mecanismo de reconocimiento materno de la gestación. Coincidiendo con estos resultados, Lozano *y col.*, (2003) encontraron una mayor producción de PGF2 α uterina en las ovejas subnutridas superovuladas. Sin embargo, en este último trabajo no se observaron diferencias en la concentración de IFN τ que secretaron los embriones de ambos grupos.

Mediadores entre el estado metabólico y el sistema reproductivo

En la oveja, las mayores demandas energéticas ocurren durante el crecimiento, la gestación avanzada y la lactación. Scaramuzzi *y col.*, (2006) sugirieron que los requerimientos energéticos para la foliculogénesis y gametogénesis no son significativos, comparados con las necesidades generales del organismo. Es posible

que tampoco lo sean durante la gestación temprana. Es más probable que los efectos de los cambios en el estado metabólico sobre la gestación temprana se ejerzan más debido a una señalización diferencial de las hormonas metabólicas, que a una falta de nutrientes *per se*. 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 y el sistema reproductivo de un animal. Entre los candidatos más probables de mediar entre los cambios nutricionales y el ambiente uterino se encuentran la insulina, el IGF-I y la leptina.

La insulina tiene múltiples efectos en el metabolismo; entre los más importantes está el facilitar la entrada de glucosa a las células desde la circulación general y estimular el almacenamiento de lípidos. El incremento de la entrada de glucosa a las células ha sido relacionado positivamente con los aumentos en la tasa ovulatoria en ovejas (Downing *y col.*, 1995). Aunque en nuestro conocimiento no hay información disponible acerca de los posibles efectos directos de la insulina en la fisiología uterina, los IGFs, péptidos relacionados con la insulina, han sido implicados en el estado del ambiente uterino.

Los IGFs (IGF-I e IGF-II) son sintetizados principalmente en el hígado, pero también pueden ser sintetizados localmente en la mayoría de los órganos, por lo que pueden actuar de forma endocrina, paracrina y autocrina (Thissen *y col.*, 1994). Los IGFs actúan a través de receptores específicos. La mayor parte de las acciones de ambos IGFs están mediadas por el receptor de IGF tipo I (IGF-IR), que tiene alta afinidad por los dos IGFs. El IGF-IIR (con una alta afinidad principalmente por el IGF-II) no tiene una función de señalización y se considera que remueve el exceso de IGF-II de la circulación (Wathes *y col.*, 1998). La actividad de los IGFs está modulada por seis proteínas de unión a IGF (IGFBPs). En el tracto reproductivo ovino se ha demostrado la expresión del mRNA de IGF-I, IGF-II y sus receptores, y algunas de las IGFBPs (Stevenson *y col.*, 1994; Stevenson y Wathes, 1996; Reynolds *y col.*, 1997). En el útero, ambos IGFs estimulan el desarrollo de los embriones pre-implantación, actúan en el desarrollo fetal y controlan el desarrollo placentario (Wathes *y col.*, 1998). La mayoría de los componentes de este sistema son alterados por la subnutrición en diferentes especies, y el IGF-I es más sensible a cambios nutricionales que el IGF-II (Thissen *y col.*, 1994). En ovejas, las concentraciones plasmáticas de IGF-I disminuyen con la restricción nutricional (Hua *y col.*, 1995). Por todo esto, el IGF-I puede ser un potente modulador del ambiente uterino frente a cambios nutricionales.

La leptina es un péptido sintetizado principalmente por el tejido adiposo, aunque también se expresa (en menor medida) en otros tejidos. Esta hormona se asoció en un principio con el control central del apetito, pero con el tiempo se ha demostrado que está implicada en múltiples procesos fisiológicos, tales como la inflamación, la hematopoyesis, la actividad inmune y la reproducción (Moschos y *col.*, 2002). La síntesis de leptina es muy sensible a cambios en el estado metabólico, aumentando frente a la sobrealimentación o suplementación y disminuyendo frente a la subnutrición o ayuno (Chilliard y *col.*, 2005). Los receptores de leptina (Ob-R) han sido localizados en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y en el tracto reproductivo, vinculando así, indiscutiblemente, a la leptina con la reproducción (Moschos y *col.*, 2002). La síntesis de leptina y de su receptor ha sido demostrada en el endometrio de mujeres y ratas (González y *col.*, 2000; Kawamura y *col.*, 2002), y en estas últimas, se demostró que la leptina añadida al medio de cultivo promueve el crecimiento del embrión en la etapa de pre-implantación (Kawamura y *col.*, 2002). En ovejas, la expresión de leptina ha sido descrita en el ovario (Muñoz-Gutiérrez y *col.*, 2005) y en la placenta (Buchbinder y *col.*, 2001), aunque todavía no ha sido demostrada su presencia o la de su receptor en el útero.

Existen otras hormonas metabólicas de más reciente descubrimiento que están siendo relacionadas con la reproducción, entre ellas, la grelina, la adiponectina y resistina (Sugino y *col.*, 2004; Budak y *col.*, 2006). Sin embargo, poco se sabe aún sobre sus efectos concretos o sobre si tienen acción a nivel uterino.

HIPÓTESIS Y ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Como se ha citado en la *Introducción*, la P4 es esencial para el mantenimiento de la gestación. Por lo tanto, es aparentemente contradictorio que las ovejas subnutridas, que presentaban menores tasas de gestación y menor desarrollo embrionario, presentaran mayores concentraciones plasmáticas de P4 (Williams y Cumming, 1982; Parr y col., 1987; Lozano y col., 1998). Sin embargo, estas mayores concentraciones no se debían a una mayor síntesis ovárica de la hormona (Lozano y col., 1998) sino, probablemente, a una menor depuración hepática en las ovejas subnutridas (Parr, 1992). Resultados previos de nuestro grupo (Lozano y col., 1998) mostraron que las ovejas subnutridas, a pesar de tener mayores concentraciones plasmáticas de P4, presentaban menores concentraciones endometriales de P4 que las ovejas controles. Como se mencionó anteriormente, las concentraciones sistémicas de las hormonas pueden no reflejar las concentraciones que recibe realmente el ambiente uterino. El hallazgo de menores concentraciones de P4 endometrial podría explicar el desarrollo embrionario inadecuado observado en las ovejas subnutridas.

Como los receptores retienen y concentran las hormonas específicas en los órganos diana, Lozano y col. (1998) propusieron la hipótesis de que las menores concentraciones endometriales de P4 podrían deberse a una menor expresión de PR endometriales. Esta fue la primera hipótesis de trabajo de esta tesis (**Artículo I**), y para probarla estudiamos el efecto de la subnutrición sobre la expresión de PR en diferentes tipos celulares del endometrio en ovejas cíclicas en la fase luteal temprana (día 5) y tardía (día 10), a partir de muestras que fueron recogidas durante el experimento de Lozano y col., (1998). Se determinó también el receptor de estrógenos (ER α), debido a que es el principal regulador de la expresión de PR en el endometrio. En primera instancia, se utilizaron solamente ovejas cíclicas para poder separar los aspectos maternos de los mediados por un posible embrión.

Tras localizar y estimar la cantidad de PR y ER α en el endometrio, los trabajos de Abecia y col., (1995; 1997; 1999a), en los que se encontró igual número de embriones viables los días 8 y 9 pero menores tasas de gestación en los días 14 y 15 en ovejas subnutridas, nos llevaron a plantear la hipótesis de que podría existir una alteración en la expresión génica endometrial de factores vinculados al reconocimiento materno de la gestación. Se conoce que el establecimiento de la gestación depende de un diálogo específico entre la madre y el embrión que se establece alrededor del día 14 de la gestación en ovinos, y en el que participan,

entre otros factores, los receptores esteroideos. En el **Artículo II**, exploramos la hipótesis de que la sensibilidad del endometrio a las hormonas esteroideas podría verse alterada en las ovejas subnutridas el día 14, nuevamente centrándonos en el lado materno y por lo tanto, trabajando con ovejas cíclicas. Si bien la metodología utilizada en el Artículo I (inmunohistoquímica) para la determinación de PR y ER α permite identificar la localización tisular de una proteína, no permite la cuantificación exacta de las proteínas sino una estimación de la abundancia de receptores, ya que su evaluación es subjetiva. Por lo tanto, en el **Artículo II** el estudio de los receptores endometriales comprendió además de su expresión en los diferentes tipos celulares del endometrio (inmunohistoquímica), su capacidad de unión a la hormona (ensayo de unión) y la concentración de mRNA –o transcriptos– en el tejido (hibridación en solución). Cabe señalar que estas dos últimas técnicas son cuantitativas, muy sensibles y específicas, y por lo tanto, permiten conocer la cantidad real de las proteínas receptoras y de sus transcriptos. Dado que los primeros días de vida embrionaria ocurren en el oviducto y que la fisiología de éste también está modulada por los esteroides ováricos, se evaluó además la expresión génica de ambos receptores esteroideos en los oviductos (**Artículo III**).

En el **Artículo I** se sugirió que la expresión de los PR podía ser regulada por la acción de hormonas que se ven alteradas por los diferentes planos nutricionales (por ejemplo, IGF-I y leptina). Hay evidencias de que algunas hormonas metabólicas pueden regular directamente la función de los receptores esteroideos (Flint *y col.*, 2002; Catalano *y col.*, 2004). Por lo tanto, era importante conocer los cambios que se producían en los metabolitos y hormonas metabólicas en nuestros diseños experimentales, y relacionarlos con las alteraciones observadas en la expresión génica uterina. Por consiguiente, en el **Artículo II** también se realizó una caracterización de los metabolitos y hormonas metabólicas.

Después de estudiar los efectos de la subnutrición sobre la expresión génica endometrial en ovejas cíclicas (considerando sólo el ambiente materno) y de caracterizar los perfiles metabólicos y endocrinos durante el ciclo estral, nuestra hipótesis de trabajo en el **Artículo IV** fue que la subnutrición podría alterar el diálogo materno-embionario en el momento del reconocimiento materno de la gestación. Por lo tanto, se investigó la expresión endometrial de varias moléculas implicadas en este mecanismo (secreción uterina de PGF2 α , y expresión endometrial de COX-2, PR, ER α , OTR e IFNAR2). En este experimento, nos centramos solamente en el día 14 e incluimos un grupo de ovejas gestantes para determinar si posibles efectos de la subnutrición observados sobre la expresión génica uterina podían deberse a una señalización insuficiente por parte del embrión.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I)** Investigar el efecto de la subnutrición sobre la localización y abundancia de los ER α y PR endometriales en ovejas cíclicas (Artículo I).
- II)** Estudiar el efecto de la subnutrición sobre la capacidad de unión y las concentraciones de mRNA de ER y PR en el endometrio de ovejas cíclicas en fase luteal temprana y tardía (Artículo II).
- III)** Caracterizar los perfiles metabólicos (glucosa, ácidos grasos no esterificados, proteínas totales, albúmina, colesterol, urea) y hormonales (P4, E2, IGF-I, insulina, leptina) en ovejas subnutridas y controles durante el ciclo sexual (Artículo II).
- IV)** Estudiar el efecto de la subnutrición sobre las concentraciones de mRNA de ER y PR en oviductos de ovejas cíclicas (Artículo III).
- V)** Investigar el efecto de la subnutrición sobre factores implicados en el proceso de reconocimiento materno de la gestación (ER α , PR, OTR, IFNAR, COX-2, secreción uterina de PGF2 α y PGE2) (Artículo IV).

METODOLOGÍA

Diseños experimentales

Aspectos generales

Todos los experimentos de esta tesis se realizaron en el Servicio de Experimentación Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España (Latitud 41°41'N), utilizando ovejas adultas de la raza Rasa Aragonesa durante la estación reproductiva descrita para esta raza en esta latitud (Forcada y col., 1992). Los protocolos fueron aprobados por la Comisión Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza.

Para sincronizar los celos se utilizó un tratamiento intravaginal de 12 días con esponjas impregnadas en progestágenos (Acetato de Fluorogestona, 40mg, Intervet S.A., Salamanca, España), al cabo del cual se administraron entre 285 y 300 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) por vía intramuscular. Los celos (identificados como día 0 del ciclo sexual o de la gestación) se detectaron cada 8 h utilizando moruecos vasectomizados (Artículos I y IV) o provistos de un mandil (Artículo II y III).

Los animales se alimentaron una vez al día (por la mañana) en base a una dieta compuesta por concentrado y paja de cebada, con libre acceso al agua. El concentrado estuvo compuesto por cebada (85%) y soja (15%). En los experimentos 1 y 2 (Artículos I, II y III) los animales se alimentaron con dietas para proveer 1,5 o 0,5 veces los requerimientos diarios de mantenimiento (M) (AFRC, 1993). La dieta 1,5 M ofrecida colectivamente asegura un mantenimiento del PV y la CC (grupo control), mientras que la dieta 0,5M provoca una disminución en el mismo período de tiempo de aproximadamente un 12% tanto en el PV como en la CC (grupo bajo) como ha sido demostrado anteriormente (Abecia y col., 1995; 1997; Lozano y col., 1998). Para lograr un mayor control del consumo de cada animal, en el experimento 3 (Artículo IV) las ovejas fueron alimentadas en jaulas individuales, y la dieta control fue ajustada para proporcionar los requerimientos diarios de mantenimiento (1M).

El PV y la CC de los animales se controlaron periódicamente durante los experimentos. La CC fue determinada por un único observador por palpación de las apófisis vertebrales en la región del lomo en una escala de 0 (emaciada) a 5 (obesa) (Russel y col., 1969), ajustando al cuarto de punto.

En todos los experimentos se tomaron muestras de sangre de la vena yugular en tubos con heparina. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 1000 g y el plasma se almacenó a -20°C hasta su análisis.

En los experimentos 1 y 2 (Artículos I, II y III) se utilizaron únicamente animales ciclando (no gestantes), para no confundir con los efectos del embrión y estudiar sólo el ambiente materno. En el experimento 3 (Artículo IV) se incorporó un grupo de ovejas gestantes.

En la Figura 3 se muestra una representación esquemática de los tres experimentos.

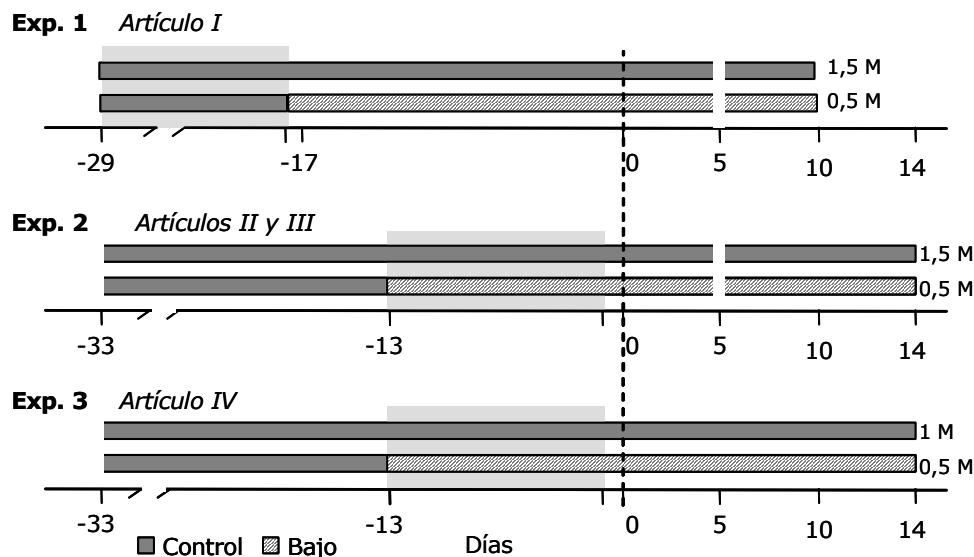


Figura 3. Representación esquemática de los diseños experimentales. Grupo control (barras grises); grupo bajo (barras rayadas). El área sombreada de gris indica el período del tratamiento con progestágenos para la sincronización de celos. La línea punteada indica el día del celo (día 0) previo al sacrificio los días 5 y 10 (Artículo I), días 5 y 14 (Artículos II y III) y día 14 (Artículo IV).

Experimento 1 (Artículo I)

Se utilizaron 26 ovejas adultas con un PV medio (\pm SEM) de $56,7 \pm 1,9$ kg y una CC media (\pm SEM) de $2,9 \pm 0,1$. A finales de septiembre, el celo de las ovejas se sincronizó con esponjas intravaginales. A su retirada, las ovejas se dividieron en dos grupos en función del PV y la CC, y se asignaron al grupo control (1,5 M, $n = 13$) o bajo (0,5 M, $n = 13$). La dieta del grupo control estuvo compuesta por 0,55

kg de concentrado y 0,80 kg de paja de cebada (12,4 MJ de energía metabolizable) y la del grupo bajo, por 0,10 kg de concentrado y 0,50 kg de paja de cebada (4,1 MJ energía metabolizable). Estas dietas se mantuvieron a lo largo de todo el experimento.

El día 5 del segundo ciclo tras la retirada de las esponjas, 6 ovejas del grupo control y 8 del grupo bajo se sacrificaron con un eutanásico (Tiobarbital, Braun Medical, Jaén, España). Las ovejas restantes (grupo control, n = 7 y grupo bajo, n = 5) se sacrificaron el día 10 del ciclo sexual. Inmediatamente tras el sacrificio, se extrajo el útero, se fijó una sección transversal del cuerno ipsilateral al CL en formaldehído al 4% y se mantuvieron en etanol hasta incluirlos en bloques de parafina por técnicas histológicas de rutina.

Otros resultados de este experimento han sido publicados previamente (Lozano y col., 1998).

Experimento 2 (Artículos II y III)

Se utilizaron 20 ovejas con un PV (\pm SEM) de $56,8 \pm 1,3$ kg y una CC de $2,8 \pm 0,1$. El día de inserción de las esponjas, a fines de febrero, las ovejas se dividieron en dos grupos: grupo control, 1,5M, n = 10 y grupo bajo, 0,5M, n = 10, con agua y suplemento mineral *ad libitum*. La proporción de concentrado y paja ofrecida, así como su contenido de energía metabolizable fue similar al Experimento 1. Este régimen nutricional se mantuvo durante todo el experimento. El PV y la CC se determinaron en el momento de colocar las esponjas, a su retirada y en el día del sacrificio (días -13, -1, 5 y 14; día 0 = celo).

Se tomaron muestras diarias de sangre de la vena yugular 1 h antes (sangrado pre-ingesta) y 6 h después de la comida (sangrado post-ingesta) desde el día -16 (4 días antes del inicio del tratamiento nutricional) hasta el sacrificio.

El día 5, 9 ovejas se sacrificaron con tiopental sódico (Euta-Lender, Normon S.A., Madrid, España) (grupo control, n = 5 y grupo bajo, n = 4). Las ovejas restantes se sacrificaron el día 14 (grupo control, n = 3 y grupo bajo, n = 5).

Tras el sacrificio, se disecó el tracto reproductivo, el cual se lavó con solución fisiológica y se mantuvo en hielo sobre placas de Petri. Se registró el número y lado de cuerpos lúteos y se disecaron los tejidos de sostén. Los oviductos se congelaron por separado en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Una sección de cada cuerno uterino (parte craneal) se congeló en nitrógeno líquido, y otra sección (parte media) de cada cuerno se fijó en paraformaldehído al 4% y se mantuvo en etanol hasta incluirla en bloques de parafina.

Experimento 3 (Artículo IV)

Se utilizaron 46 ovejas con un PV de $61,2 \pm 2,2$ kg y una CC de $3,4 \pm 0,1$. Un mes antes de la sincronización de celos (octubre), se alojaron en jaulas individuales y se alimentaron con la dieta control (1M). La dieta estuvo compuesta por 0,42 kg de concentrado y 0,70 kg de paja de cebada (7,8 MJ de energía metabolizable). En el momento de la inserción de las esponjas, los animales se dividieron en dos grupos: grupo control ($n = 21$) que continuó con la misma dieta (1M), y grupo bajo ($n = 25$), al que se le ofreció la mitad de la dieta control (0,5M) para proveer 3,9 MJ de energía metabolizable. A la retirada de las esponjas, 13 ovejas control y 18 del grupo bajo fueron cubiertas con machos enteros para establecer un grupo gestante, mientras que al resto sólo se les detectó el celo usando moruecos vasectomizados. Desde una semana antes de que comenzaran las dietas diferenciales, hasta el final del experimento, se tomaron muestras de sangre cada dos días (una hora antes de la comida). El PV y la CC se determinaron al momento de colocar las esponjas, a su retiro y en el día del sacrificio (días -13, -1 y 14; día 0 = celo).

Las ovejas se sacrificaron el día 14 del ciclo sexual o de la gestación (T-61®, Intervet S.A, Salamanca, España). Los cuernos uterinos se lavaron con solución tampón (tampón fosfato salino, PBS) y la presencia de embrión/es se utilizó como indicador de gestación. El tracto reproductivo se procesó como en el Experimento 2. Además, se incubó una sección de endometrio (aproximadamente 100 mg) para determinar la secreción endometrial de PGs *in vitro*.

Determinaciones en plasma

Metabolitos

Los ácidos grasos no esterificados (AGNE) se determinaron mediante un kit comercial (Nefa-C, Wako Chemicals GmbH, Alemania) según las modificaciones de Johnson y Peters (1993). Las proteínas totales, albúmina, urea, colesterol y aspartato amino transferasa (AST) se analizaron con kits de Laboratorios Wiener (Argentina) en un multi-analizador (Vitalab Spectra 2, Vital Scientific).

Hormonas

Todas las hormonas fueron analizadas por radioinmunoanálisis (RIA).

Las concentraciones de P4, E2 e insulina se determinaron por RIA en fase sólida utilizando kits comerciales (Diagnostic Product Co., Los Angeles, CA, USA). Las concentraciones de IGF-I y leptina se determinaron según lo descrito por Gluckman y col., (1983) y Blache y col., (2000), respectivamente.

Determinaciones en el tracto reproductivo

Trascriptos de los receptores esteroideos (Artículos II y III)

Las concentraciones de mRNA de PR y ER se determinaron mediante un ensayo de hibridación en solución siguiendo el método descrito por Meikle y col. (2000b). La sonda de ER estaba dirigida contra una secuencia específica del ER α . Los ácidos nucleicos totales (TNA) se obtuvieron por digestión de tejidos homogeneizados (50 - 200 mg) con proteinasa K en buffer SDS seguido de extracción con fenol-cloroformo. La concentración de DNA en las muestras de TNA se midió por espectrofotometría a 260 nm. Las sondas de hibridación utilizadas para la determinación de mRNA de ER α y PR en las muestras se obtuvieron de plásmidos contenido 360 o 314 pb de cDNA de ER α y PR ovino, respectivamente. El cDNA de ER α -contenido en el vector pGEM4Z- se obtuvo por restricción con EcoRI, y el de PR -contenido en el vector pCRII- por restricción con HindIII. Las sondas se sintetizaron por acción de la RNA polimerasa T7 sobre fragmentos de cDNA y se marcaron radiactivamente con 35 S-UTP (Amersham, Buckinghamshire, UK). El 35 S-UTP-cRNA se hibridó a las muestras de TNA a 70°C. Las muestras se incubaron por duplicado durante la noche y luego se trataron con las RNAsas A y T1 (Boeringer-Mannheim, Mannheim, Alemania) durante 45 min a 37°C para digerir el RNA no hibridado. Los híbridos marcados -protegidos de la digestión por RNAsas- se precipitaron con ácido tricloroacético y se recogieron en filtros Whatman (GF/C). La radioactividad de los filtros sumergidos en líquido de centelleo, se determinó en un contador de emisiones beta.

Capacidad de unión de los receptores esteroideos (Artículo II)

La capacidad de unión de los receptores esteroideos uterinos se estudió por ensayos de unión como ha sido descrito previamente (Garófalo y Tasende, 1996). Cabe puntualizar que mediante esta técnica no es posible diferenciar entre los diferentes subtipos de ER analizados, ya que se estudia la cantidad de hormona radioactiva que se une a los receptores solubles. Se homogeneizaron secciones congeladas de la parte craneal de cada cuerno uterino y se separaron mediante dos centrifugaciones a 4°C (15 min a 1000 g y 90 min a 40000 g). Se extrajo el sobrenadante (también llamado "fracción citosólica") y se incubó cuatro replicados de éste con 5 concentraciones conocidas de 3 H-E2 (86 Ci/mmol, 0.3 a 15 nM) o 6 concentraciones conocidas de 3 H-ORG-2058 (40 Ci/mmol, 0.5 a 30 nM; Amersham, Buckinghamshire, UK). A dos de los duplicados se agregó además un exceso de la hormona correspondiente no marcada radiactivamente. Tras una incubación de 18 h a 4°C, los esteroides libres (es decir, que no se unieron a receptores del tejido)

se separaron con carbón dextrano y la radioactividad se midió en un contador de líquido de centelleo. Debido a la homogeneización y a la ruptura celular, la mayoría de los receptores (de localización nuclear) se encuentran, tras la centrifugación diferencial, en la fracción citosólica. Meikle y col., (2000b) demostraron que menos del 10% de los receptores totales permanecía en la fracción nuclear, y que los mayores cambios observados se debían, por lo tanto, a las variaciones en la fracción citosólica. La concentración de proteínas totales de la fracción citosólica se determinó por el método de Lowry y col., (1951). Para obtener las constantes de disociación (K_d) (reflejo de la afinidad del receptor por su ligando) y la concentración de receptores (fmol/mg proteína), los datos se analizaron utilizando un test de regresión lineal del modelo inverso de Scatchard (Braunsberg, 1984). La concentración de proteínas y la cantidad de tejido utilizado en los ensayos estuvieron correlacionadas positivamente ($r = 0,83$; $n = 15$; $P < 0,0001$), indicando que la extracción de proteínas citosólicas fue similar en todas las muestras. La afinidad media (K_d) de los receptores por la P4 ($1,05 \pm 0,54$ mM) y por el E2 ($1,21 \pm 0,52$ mM) no difirió entre tratamientos nutricionales y entre días del ciclo estral y estuvo dentro de los rangos observados previamente para los receptores esteroideos (Garófalo y Tasende, 1996; Meikle y col., 1997; Tasende y col., 2002).

Abundancia y localización tisular de proteínas (Artículos I, II y IV)

Para localizar las diferentes proteínas sobre las secciones de útero y estimar su abundancia, se utilizó la técnica de inmunohistoquímica (sistema avidina-biotina-peroxidasa) previamente descrita por Meikle y col., (2000a). Los cortes de tejido (5 μm) se desparafinaron y rehidrataron en concentraciones decrecientes de etanol. Las secciones se sumergieron en citrato de sodio 0,01 M (pH 6) pre-calentado y se llevaron al microondas (a 900 watt de potencia) durante 5 min, para mejorar la exposición antigenica. Tras un lavado en solución tampón (PBS 0,01 M, pH 7,5), se bloqueó la actividad inespecífica de las peroxidasas endógenas con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 10 min a temperatura ambiente. Después de un lavado de 10 min en PBS, los preparados se incubaron con suero de caballo (Vectastain; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 60 min en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego, se los incubó durante 1 h con el anticuerpo primario correspondiente para la detección de cada proteína, diluido en PBS: anti-PR (Zymed, South San Francisco, CA, USA); anti-ER α y anti-IFNAR2 (Santa Cruz, California, USA); anti-OTR (Rohto Pharmaceutical, Japón) y anti-COX-2 (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA). Los controles negativos se obtuvieron reemplazando el anticuerpo primario por un suero inespecífico a una

concentración equivalente. Tras la unión al anticuerpo primario, los tejidos se incubaron durante 60 min con un anticuerpo secundario biotinilado (Vectastain, Vector) diluido en suero de caballo, y luego 60 min más 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'-diaminobencidina (DAB, Vector), un cromógeno que produce un precipitado marrón insoluble cuando se incuba junto con la enzima. Las secciones de tejido se colorearon con hematoxilina y se deshidrataron en etanol antes de ser montadas con cemento sintético.

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 dos observadores independientes que desconocían la conformación de los grupos. En el *Artículo I*, la expresión de PR se estudió en 8 compartimientos histológicos. El epitelio luminal se clasificó en dos regiones: caruncular e intercaruncular. El epitelio glandular se dividió según su ubicación en: superficial y profundo. El estroma se clasificó en estroma caruncular superficial y profundo, y estroma intercaruncular superficial y profundo. En los *Artículos II y IV*, sólo se estudió la región intercaruncular. Se analizaron 10 campos por compartimiento histológico por animal a un aumento de 1000X. La intensidad de tinción se clasificó en 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).

Concentración endometrial de progesterona (Artículo IV)

La concentración de P4 en el tejido uterino se determinó siguiendo la técnica de Abecia *y col.* (1996). Se homogeneizaron secciones de útero (alrededor de 500 mg) en 10 mL de una solución tampón isotónica, y el sobrenadante se recogió tras una centrifugación a 1000g durante 10 min. Sobre el sobrenadante, se realizaron 4 extracciones de esteroides con 2 mL de dietil-éter cada vez, recuperando la fase acuosa superior. Tras la evaporación del éter, se resuspendieron los esteroides en 300 μ L de la solución tampón isotónica y se almacenó a -20°C hasta su procesamiento. Las concentraciones de P4 se determinaron por RIA siguiendo el mismo procedimiento que para la determinación de P4 plasmática. Las concentraciones obtenidas se corrigieron para la cantidad (mg) de tejido utilizado en la extracción.

Secreción in vitro de PGF2 α y PGE2 endometriales (Artículo IV)

En el momento del sacrificio, las secciones de útero (de aproximadamente 100 mg) se colocaron en placas de cultivo de 24 pocillos conteniendo 500 μ L de medio de cultivo, y se incubaron durante 24 h a 37°C en una atmósfera de 95% O₂ y 5% CO₂. El medio de cultivo estuvo compuesto por medio Ham's F-12 (Sigma) suplementado con penicilina-estreptomicina, L-glutamina, insulina, transferrina y selenio, según lo descrito por Thibodeaux *y col.* (1994). Tras la incubación, se recogió el medio de cultivo y se almacenó a -20°C. Las concentraciones de PGF2 α y PGE2 se analizaron por ELISA, mediante kits comerciales (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA) y las concentraciones de PG se corrigieron por la cantidad (mg) de tejido incubado y se expresaron como ng PG/mg tejido.

Análisis estadístico

Las concentraciones de metabolitos y hormonas plasmáticas y endometriales, las concentraciones de receptores y proteínas en el tracto reproductivo y el PV y la CC, se analizaron por análisis de varianza utilizando un modelo mixto (Statistical Analysis System, SAS, Institute Inc., Cary, NC, USA). El modelo de análisis de las concentraciones de los metabolitos y hormonas incluyó los efectos del tratamiento, del día del ciclo y de su interacción. Estas variables se estudiaron por análisis de medidas repetidas, y las observaciones previas al inicio del tratamiento se incluyeron en el modelo como covariables. En el modelo de análisis de las concentraciones endometriales de receptores y proteínas se incluyó alguno de los siguientes efectos fijos según el diseño experimental: tratamiento nutricional, día del ciclo estral o gestación, lado respecto al CL (ipsilateral o contralateral), gestación y sus interacciones. En el *Artículo IV*, la tasa de ovulación se analizó por la prueba *t* de Student, y las diferencias en porcentajes de gestación, por la prueba de Chi cuadrado. El nivel de significación considerado fue siempre P < 0,05 y los valores de P comprendidos entre 0,05 y 0,1 se consideraron como tendencia.

RESULTADOS

Respuesta metabólica al tratamiento nutricional

El tratamiento nutricional al que se sometió a los animales en los tres experimentos provocó la respuesta esperada en cuanto a cambios en el PV y la CC, y a la modificación de los perfiles de AGNE y hormonas metabólicas. En todos los experimentos las ovejas subnutridas presentaron una disminución del PV (9-12%) y de la CC (14-15%) a lo largo del experimento, mientras que las ovejas de los grupos controles mantuvieron ambos parámetros (Tabla 1).

Tabla 1. Variaciones de peso vivo (PV) y condición corporal (CC) previo al comienzo de las dietas diferenciales (inicial) y en el momento del sacrificio (final) en ovejas alimentadas para mantener el PV y la CC (grupo control: 1,5M en Artículos I, II y III; 1M en Artículo IV) o alimentadas a la mitad de los requerimientos para el mantenimiento (grupo bajo: 0,5M). Las diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los valores iniciales y finales de PV y CC dentro de un mismo grupo están indicados con diferentes superíndices.

	Artículo I		Artículos II y III		Artículo IV	
	Control	Bajo	Control	Bajo	Control	Bajo
PV inicial	56,2 ± 2,5 ^a	56,8 ± 1,8 ^a	56,8 ± 0,4 ^a	56,7 ± 0,3 ^a	61,2 ± 0,4 ^a	61,2 ± 0,4 ^a
PV final	55,6 ± 3,3 ^a	50,0 ± 5,8 ^b	57,1 ± 0,6 ^a	49,7 ± 0,4 ^b	60,5 ± 0,4 ^a	56,3 ± 0,4 ^b
CC inicial	2,9 ± 0,2 ^a	2,9 ± 0,1 ^a	2,8 ± 0,1 ^a	2,8 ± 0,1 ^a	3,4 ± 0,1 ^a	3,4 ± 0,1 ^a
CC final	2,9 ± 0,2 ^a	2,3 ± 0,3 ^b	2,7 ± 0,1 ^a	2,4 ± 0,1 ^b	3,2 ± 0,1 ^a	2,9 ± 0,1 ^b

En el *Artículo II*, las ovejas subnutridas presentaron mayores concentraciones plasmáticas de AGNE, y menores de leptina que las ovejas controles, desde el día siguiente al comienzo del tratamiento nutricional diferencial (Figura 4). Las concentraciones de glucosa presentaron una tendencia a ser mayores en el grupo subnutrido que en el grupo control, siendo las diferencias significativas los días -10, -3, -2, 10 y 14 (día 0 = estro para todos los experimentos). En general, las ovejas controles presentaron mayores concentraciones de insulina que las subnutridas y mostraron una tendencia hacia una mayor concentración de IGF-I. El efecto del tratamiento nutricional sobre las concentraciones de insulina varió según el momento con respecto a la comida. En las muestras tomadas 6h tras la comida, el grupo control presentó mayores niveles de insulina en los días -12, -11, -2 a 2, y

11 y 12, siendo las diferencias más acusadas alrededor del estro. En las muestras tomadas 1h antes de la comida, la diferencia entre grupos sólo se observó los días 0 y 1. Las concentraciones de IGF-I en el grupo control también fueron mayores que en el grupo bajo alrededor del celo (días 1 a 4) y en los días -4 y 12. Un hallazgo interesante de este experimento fue que las concentraciones de glucosa, insulina e IGF-I presentaron un pico alrededor del estro, muy pronunciado en el grupo control y menos evidente en el grupo subnutrido (Figura 4).

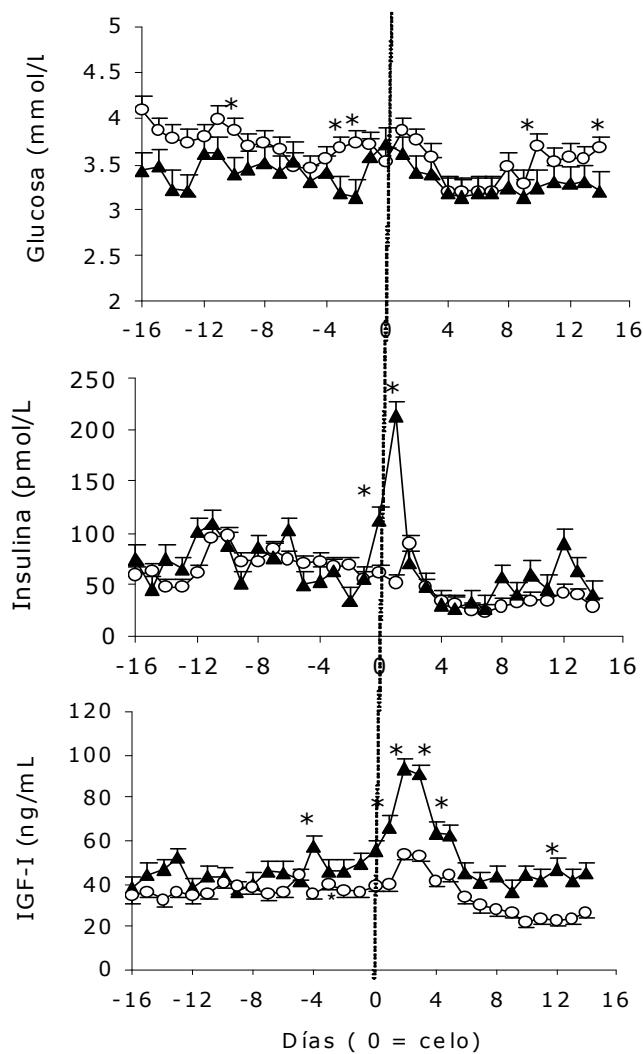


Figura 4. Concentraciones de glucosa, insulina (pre-ingesta) e IGF-I de ovejas alimentadas 0,5 (Bajo, O) o 1,5 (Control, ▲) veces los requerimientos para mantenimiento desde el día -13 al 14 (día 0 = celo, línea punteada). Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre grupos, $P < 0,05$ (Artículo II).

En el *Experimento 3* también se analizaron las concentraciones plasmáticas de glucosa, AGNE, insulina, IGF-I y leptina (datos no publicados, Figura 5).

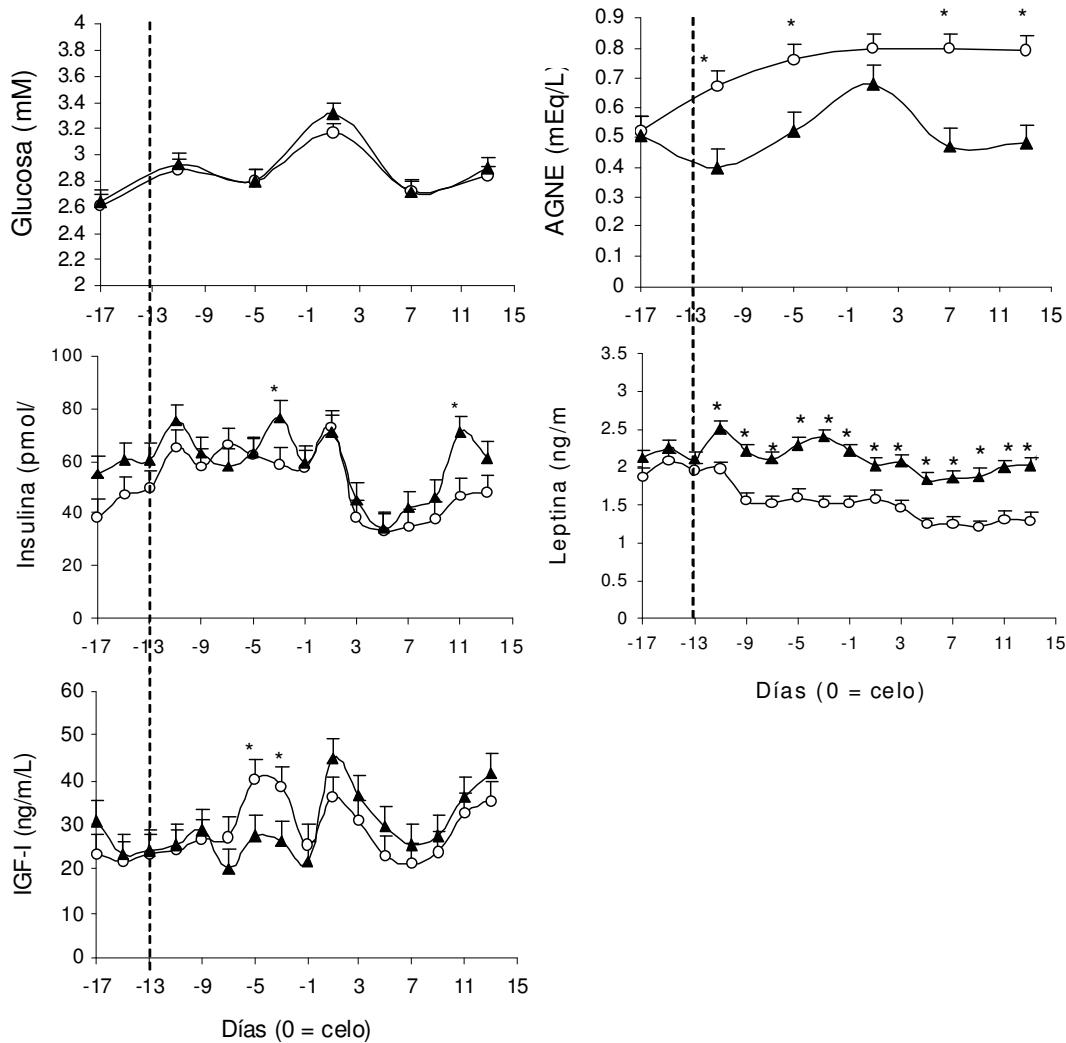


Figura 5. Concentraciones de glucosa, AGNE, insulina, IGF-I y leptina de ovejas alimentadas 0,5 (Bajo, ○) o 1 (Control, ▲) vez los requerimientos para mantenimiento desde el día -13 (línea punteada) al 14 (día 0 = celo). Se agrupó al grupo cíclico y gestante ya que no se observaron diferencias entre ellos. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre los grupos, $P < 0,05$ (*Experimento 3, datos no publicados*).

Como se esperaba, las ovejas subnutridas presentaron mayores concentraciones de AGNE y menores de leptina desde el día siguiente al comienzo de las dietas

diferenciales ($P < 0,0001$). El grupo control presentó mayores concentraciones de insulina los días -3 y 11 ($P < 0,05$), y menores concentraciones de IGF-I los días -5 y -3 ($P < 0,05$). Como fue observado anteriormente (*Artículo II*), también en este experimento se encontró un aumento de glucosa e IGF-I en el momento del celo. No se observó un aumento en las concentraciones de insulina en el celo, pero sí una disminución tras éste y hacia el día 5 en ambos grupos. A diferencia del experimento anterior, se observó un aumento al celo de las concentraciones de AGNE del grupo control.

Efecto de la subnutrición sobre las concentraciones de 17 β -estradiol y progesterona en plasma y endometrio

En el *Artículo II*, las concentraciones de P4 aumentaron gradualmente después del celo en ambos grupos, pero las concentraciones del grupo subnutrido alcanzaron valores máximos mayores que el grupo control, siendo diferentes los días 12 y 13 (Figura 6). Asimismo, las concentraciones de E2 tendieron a ser mayores en las ovejas subnutridas, con diferencias significativas entre los días 4 y 6 (Figura 6). En el *Artículo IV* no se observaron diferencias en las concentraciones plasmáticas de P4 debido al tratamiento nutricional en ninguno de los días del ciclo sexual observados, ni tampoco en las concentraciones endometriales el día 14 (datos no mostrados).

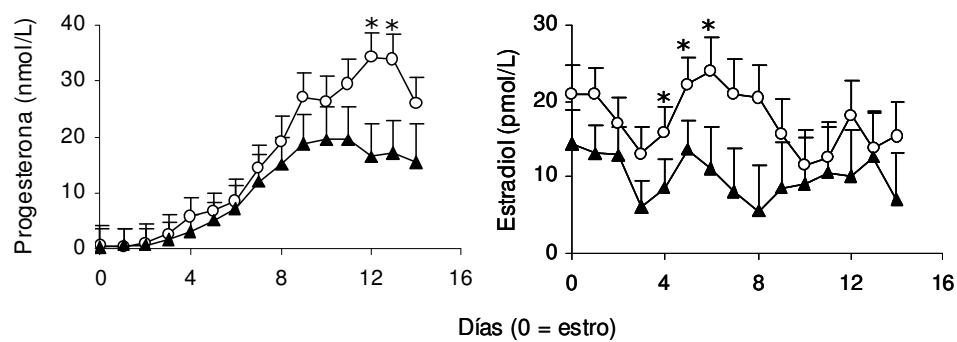


Figura 6. Concentraciones de progesterona y estrógenos de ovejas alimentadas 0,5 (Bajo, O) o 1,5 (Control, ▲) veces los requerimientos para mantenimiento desde el día 0 (celo) al día 14. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre grupos, $P < 0,05$ (*Artículo II*).

Efecto de la subnutrición sobre la sensibilidad del tracto reproductivo a los estrógenos y a la progesterona en ovejas cíclicas

En el *Artículo I*, la subnutrición provocó una disminución de los PR en la mayoría de los tipos celulares estudiados (5 de 8) el día 5 del ciclo, pero no el día 10 (Figura 7). Para ER α el mismo patrón se observó en el estroma caruncular superficial.

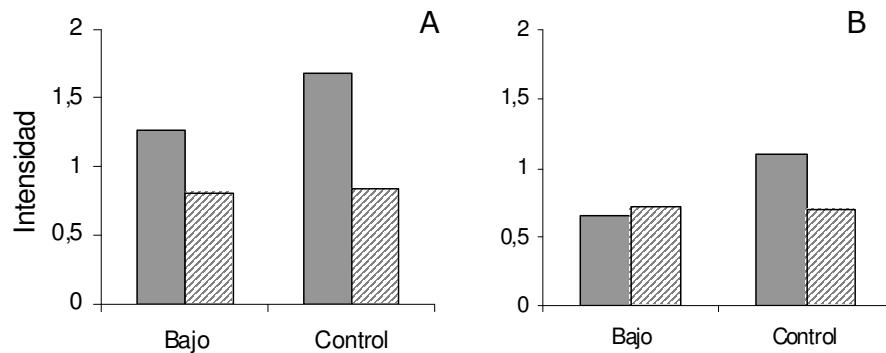


Figura 7. Promedio de la intensidad de tinción de PR en los epitelios (A) y en el estroma (B) en el grupo bajo (0,5 M) y control (1,5 M) los días 5 (■) y 10 (□) del ciclo sexual. Grupo bajo: día 5, n = 8 y día 10, n = 5; Grupo control, día 5, n = 6 y día 10, n = 7 (*Artículo I*).

En el *Artículo II*, tanto PR como ER presentaron una menor capacidad de unión al ligando en las ovejas subnutridas el día 5 pero no el día 14 (Figura 8, C-D). Sin embargo, esto no se correlacionó con la expresión de mRNA, donde sólo se observó ese patrón para PR en el cuerno uterino contralateral al CL (Figura 8, A-B). Las ovejas subnutridas presentaron menor tinción de ER α que las controles en el epitelio luminal (ambos días) y en el epitelio glandular superficial (día 5). No se observó un efecto del tratamiento nutricional sobre la intensidad de tinción de PR en ninguno de los tipos celulares.

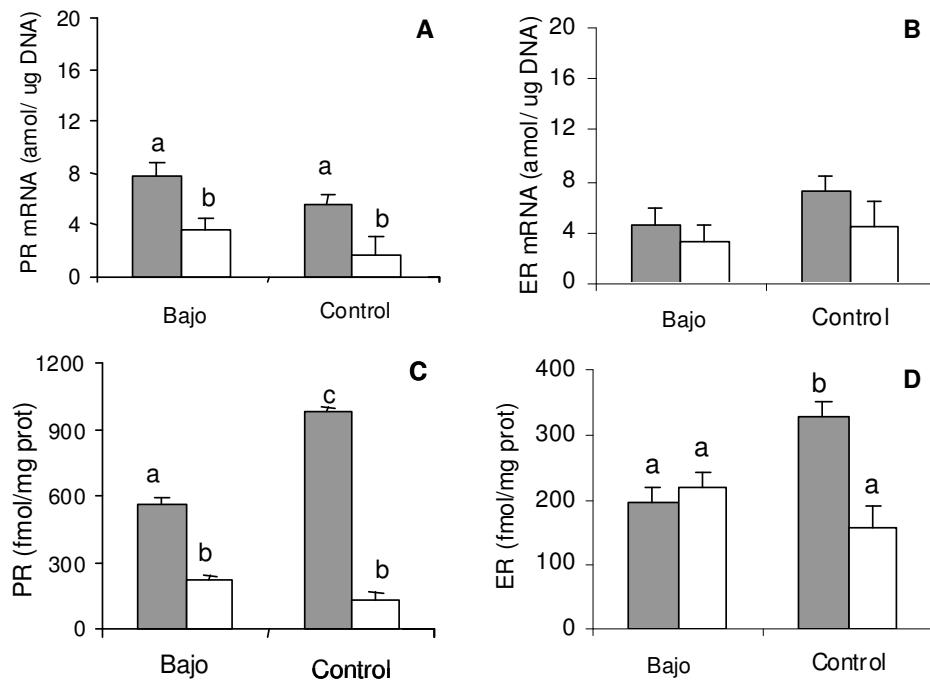


Figura 8. Expresión de los transcriptos (amol/μg DNA) y de las proteínas (fmol/mg prot) de PR (izquierda) y ER (derecha) en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo en el grupo bajo (0,5 M) y control (1,5 M) los días 5 (■) y 14 (□) del ciclo sexual. A) mRNA de PR; B) mRNA de ER α ; C) capacidad de unión de PR, y D) capacidad de unión de ER. Grupo bajo: día 5, n = 4 y día 14, n = 4; Grupo control, día 5 y día 14, n = 2. Letras diferentes indican diferencias dentro del mismo gráfico, a,b: P < 0,05 (*Artículo II*).

En el *Artículo III* se demostró por primera vez el efecto negativo de una restricción alimenticia sobre la expresión de transcriptos para PR y ER α en el oviducto ipsilateral al CL en la especie ovina. Los oviductos ipsilaterales al CL de ovejas subnutridas presentaron una menor concentración de transcriptos de PR y ER α que las ovejas control, el día 5 del ciclo sexual. La expresión de PR de las ovejas subnutridas también fue menor que el de las controles el día 14.

En las ovejas cíclicas del *Artículo IV* la subnutrición tendió a aumentar la intensidad de tinción de PR en las glándulas profundas el día 14 del ciclo (Figura 9). El epitelio luminal estuvo desprovisto casi totalmente de tinción para PR, aunque las ovejas cíclicas subnutridas presentaron un 12% de células positivas, con tinción leve. Las ovejas cíclicas subnutridas presentaron una tendencia hacia una mayor intensidad de tinción de ER α que las controles en el epitelio luminal.

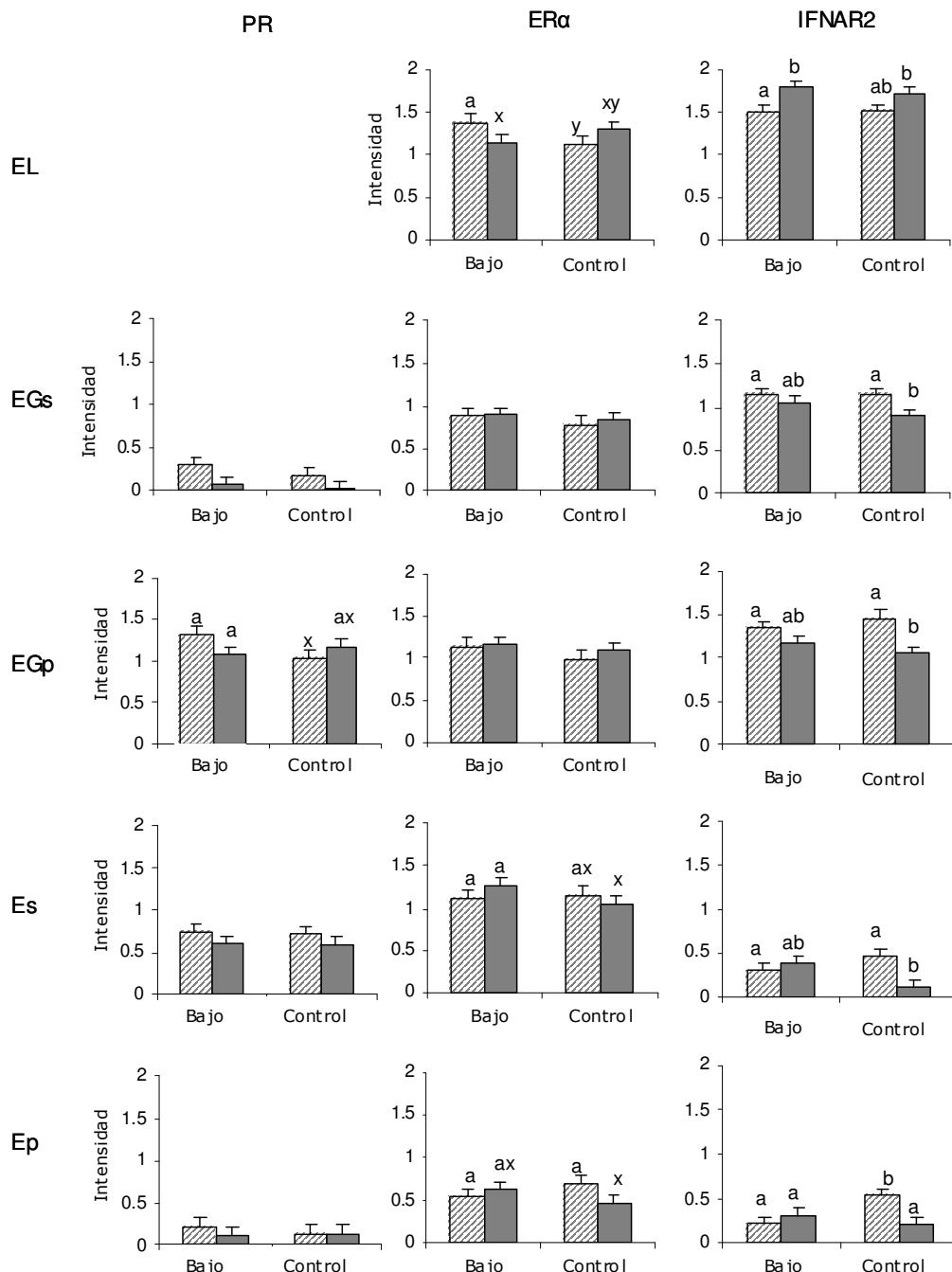


Figura 9. Intensidad de tinción de PR (izquierda), ER α (centro) e IFNAR2 (derecha) en el endometrio de ovejas alimentadas con 0,5 (Bajo) o 1 (Control) vez los requerimientos para mantenimiento, cíclicas (□) o gestantes (■), el día 14 del ciclo sexual o de la gestación. EL = epitelio luminal, EGs = epitelio glandular superficial, EGp = EG profundo, Es = estroma superficial, Ep = estroma profundo. Cíclicas bajo, n = 6; Gestantes bajo, n = 7; Cíclicas control, n = 5; Gestantes control, n = 6. Letras diferentes indican diferencias dentro del mismo gráfico, a,b,c: P < 0,05; a,x,y: P ≤ 0,1 (Artículo IV).

Efecto de la subnutrición y de la gestación sobre factores asociados al reconocimiento materno de la gestación (Artículo IV)

Efecto de la subnutrición

En general, no se observó un efecto de la subnutrición sobre la expresión endometrial de PR, IFNAR2 y COX-2, o en la síntesis endometrial de PGs en las ovejas gestantes. En estas ovejas la subnutrición tendió a aumentar los ER α en el estroma superficial (un 20% más de intensidad de tinción) y disminuyó los OTR en el estroma profundo. La expresión de PR, ER α e IFNAR2 se presenta en la Figura 9. En la Figura 10 se puede observar el inmunomarcado para cada proteína. La tinción de COX-2 se detectó casi exclusivamente en el epitelio luminal y con casi la totalidad de células positivas. En este tipo celular no hubo efecto de la nutrición ni de la gestación. Se observaron algunas células positivas (menos del 8%) en las glándulas superficiales de las ovejas cíclicas control, pero de una intensidad de tinción muy leve.

Efecto de la gestación

La gestación tendió a disminuir la intensidad de tinción de ER α en el epitelio luminal del grupo bajo y en el estroma profundo del grupo control. Por otro lado, aumentó la intensidad de tinción de OTR en el estroma profundo del grupo control.

En las glándulas y el estroma del grupo control, la expresión de IFNAR2 fue mayor en las ovejas cíclicas que en las gestantes, pero esto no se observó en el epitelio luminal. En las ovejas subnutridas, por el contrario, el efecto de la gestación se observó sólo en el epitelio luminal donde las ovejas cíclicas presentaron menor intensidad de IFNAR2 que las gestantes.

La gestación disminuyó la secreción uterina de PGF2 α tanto en ovejas subnutridas como controles. Las ovejas cíclicas subnutridas secretaron menos PGE2 *in vitro* que las controles, aunque no se observó diferencia en las ovejas gestantes (Figura 11).

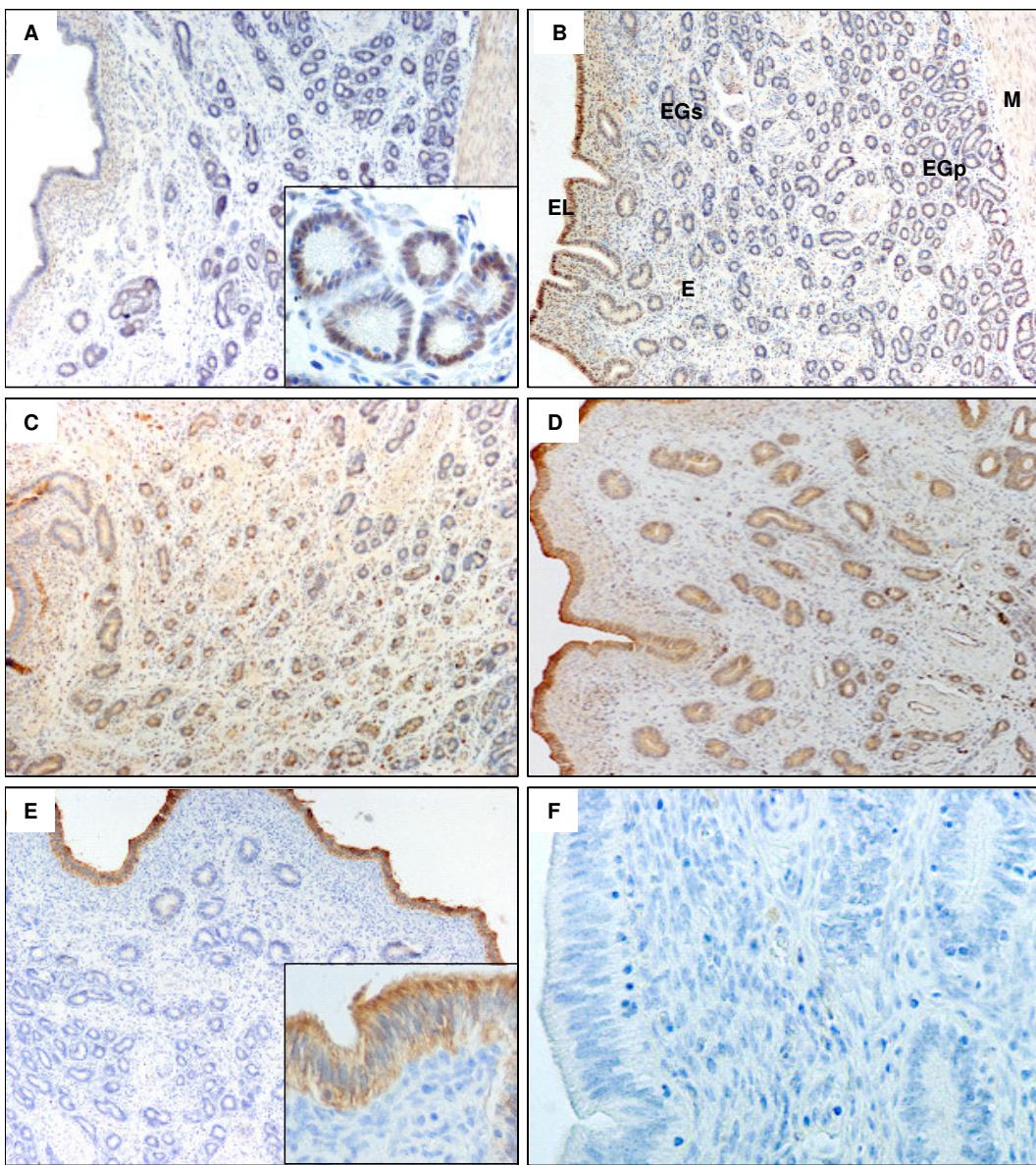


Figura 10. Inmunomarcado de PR (A), ER α (B), OTR (C), IFNAR2 (D) y COX-2 (E) (Aumento: 100X). EL = epitelio luminal, EGs = epitelio glandular superficial, EGp = EG profundo, E = estroma, M = miometrio. Obsérvese la tinción nuclear característica de PR y ER α en la imagen inserta en A, y la tinción citoplasmática característica de OTR, IFNAR2 y COX-2 en la imagen inserta en E (Aumento: 400X). Cuando se sustituyeron los anticuerpos específicos, la ausencia de inmunomarcado confirmó la especificidad de la tinción (F, Aumento: 400X) (*Artículo IV*).

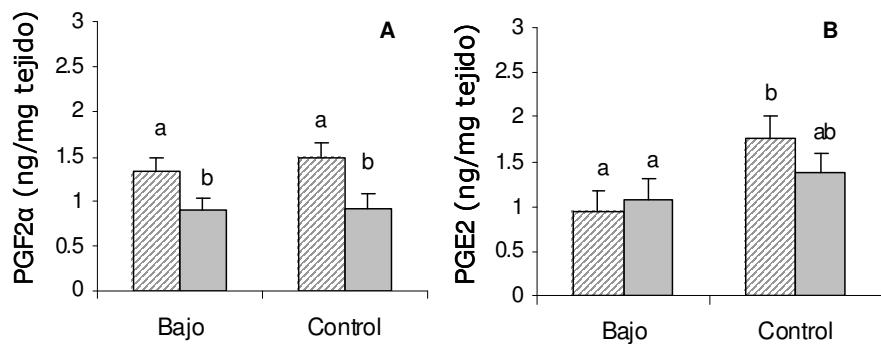


Figura 11. Concentraciones de prostaglandina (PG) F2 α (A) y PGE2 (B) en el medio de cultivo endometrial de ovejas cíclicas (□) y gestantes (■), alimentadas 0,5 (Bajo) o 1 (Control) vez los requerimientos para mantenimiento desde el día -13 al 14 (día 0 = celo). Trozos de endometrio fueron incubados durante 24h a 37°C bajo 5% CO₂ en medio Ham's F12 suplementado. Letras diferentes indican diferencias dentro del mismo gráfico, a,b: P < 0,05 (Artículo IV).

Efecto del día del ciclo estral y del tipo celular sobre el contenido endometrial de receptores de estrógenos y progesterona

Efecto del día del ciclo estral

Las ovejas controles del *Artículo I* presentaron más PR el día 5 que el día 10 en seis de ocho tipos celulares (Figura 7), pero este efecto del día del ciclo sexual sólo se observó en el epitelio luminal y en el glandular superficial en las ovejas subnutridas. Este patrón también se observó en la expresión de ER α (mayor expresión el día 5 que el día 10) pero sólo en el epitelio glandular profundo del grupo control.

En el *Artículo II*, la capacidad de unión de ER y PR fue mayor el día 5 que el día 14, en ambos grupos para PR pero sólo en el grupo control para ER, y tanto en el lado ipsilateral como en el contralateral (Figura 8, C-D). La expresión de transcriptos siguió el patrón de mayores concentraciones el día 5 en el cuerno contralateral para ER α y en el cuerno ipsilateral para PR (Figura 8, A-B). En general, hubo mayor intensidad de tinción de ER α y PR el día 5 que el día 14.

Efecto del tipo celular

En lo referente a la distribución de las proteínas según el tipo celular y la ubicación observada tras la inmunohistoquímica, la expresión de ER α fue mayor en las glándulas profundas que en las superficiales (*Artículos I, II y IV*), inversamente a la

expresión de PR (*Artículos I y II*). Ambos receptores se expresaron con mayor intensidad en el estroma superficial que en el profundo. Un resumen de la localización celular y abundancia de PR y ER α los días 5, 10 y 14 en el grupo control (*Artículos I y II*) se presenta en la Figura 12. En el *Artículo IV* las glándulas superficiales presentaron un menor porcentaje de células positivas -y de menor intensidad de tinción- a PR, ER α e IFNAR2 que las glándulas profundas (Figura 9), pero una mayor tinción de OTR.

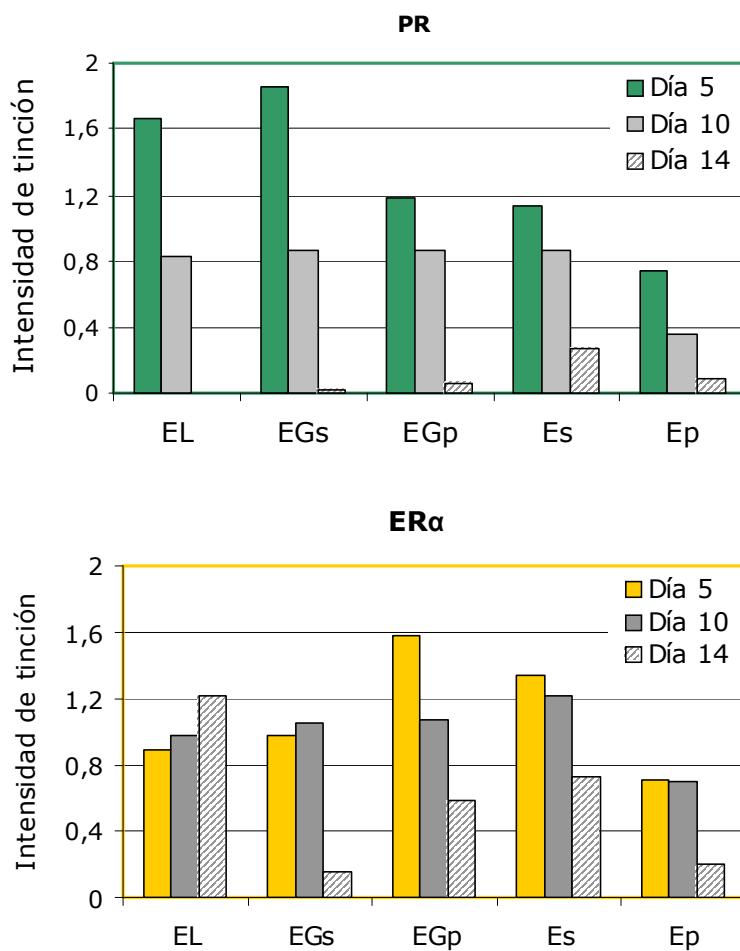


Figura 12. Resumen de localización celular y abundancia de PR (arriba) y ER α (abajo) los días 5, 10 y 14 en el grupo control. EL: epitelio luminal, EGs: epitelio glandular superficial, EGp: epitelio glandular profundo, Es: estroma superficial, Ep: estroma profundo. Los datos pertenecen a los trabajos ya publicados: días 5 y 10, *Artículo I*; día 14, *Artículo II*.

DISCUSIÓN

Respuesta metabólica al tratamiento nutricional

En los diferentes experimentos, ovejas adultas se sometieron a períodos de subnutrición de entre 18 y 27 días (dependiendo del día de sacrificio). El tratamiento nutricional fue eficaz produciendo los cambios deseados: disminución del PV y de la CC desde el comienzo de la nutrición diferencial, con la alteración de perfiles metabólicos como consecuencia del estado de déficit energético provocando efectos "dinámicos" sobre la reproducción. El Experimento 3 fue diferente a los dos anteriores en cuanto a los rangos en los que fluctuaron el PV y la CC. Como el PV y la CC iniciales de los animales del Experimento 3 fueron mayores (alrededor de un 10%) que los de los experimentos anteriores, y el porcentaje de pérdida de PV y CC de las ovejas subnutridas fue similar, los valores finales de las ovejas subnutridas del Experimento 3 fueron mayores que los de los experimentos anteriores. De esta forma, las ovejas subnutridas de este experimento tenían, al momento del sacrificio, un PV y una CC equivalentes al de las ovejas controles en el resto de los experimentos. Esta es una puntuación relevante, ya que al observar las variables metabólicas y endocrinas y las tasas de gestación obtenidas en el Experimento 3 (ver debajo), surge como una nueva hipótesis de trabajo la importancia del efecto "estático" de la nutrición y la interrelación de ambos efectos (estático y dinámico) sobre los parámetros metabólicos y reproductivos. Esta hipótesis se desarrollará en la última sección de la *Discusión*.

A pesar de que en el Experimento 3 las ovejas subnutridas tenían mayores reservas corporales que las del Experimento 2, en ambos casos el tratamiento nutricional provocó una movilización de las reservas grasas, como lo demuestran las concentraciones elevadas de AGNE y disminuidas de leptina, ya que cuando los aportes no satisfacen los requerimientos energéticos, el animal dispone de sus reservas de triacilglicéridos para su utilización por los diferentes tejidos (Chilliard *y col.*, 1998). La menor concentración de leptina en los animales subnutridos es consistente con la literatura (para revisión ver, Chilliard *y col.*, 2001; Moschos *y col.*, 2002), y podría actuar como una señal para aumentar el apetito, y disminuir el gasto de energía y la actividad reproductiva (Chilliard *y col.*, 2000). Sin embargo, hubo diferencias entre ambos experimentos en cuanto a la respuesta a la subnutrición de las concentraciones de glucosa, insulina e IGF-I. Mientras que en las ovejas subnutridas del experimento 2 se observó una mayor concentración de glucosa junto con menores concentraciones de insulina e IGF-I; en el experimento 3 no se observaron diferencias en la concentración de glucosa, y solo en días

específicos las ovejas subnutridas presentaron menores niveles de insulina. Esto último puede deberse a la diferencia en el número de observaciones debido a la diferente frecuencia de muestreo (todos los días en el Experimento 2 vs. cada dos días en el Experimento 3). También es probable que los cambios metabólicos del organismo para adaptarse al nuevo estado fisiológico no hayan sido de la misma índole en los dos experimentos ya que el estado de reservas corporales inicial de las ovejas fue diferente. Las concentraciones de glucosa tendieron a ser mayores en las ovejas subnutridas (Artículo II) o no se observó efecto de la subnutrición (Artículo IV). En los rumiantes, la glicemia es mantenida dentro de un estrecho margen y la insulina está involucrada en la regulación constante de las concentraciones de glucosa (Bassett y col., 1971). En condiciones normales, los tejidos de los rumiantes dependen del transporte de glucosa promovido por la insulina tanto como en los no rumiantes. Sin embargo, en períodos de restricción de energía (por ejemplo, en la gestación avanzada) ocurre una nueva distribución y utilización de los nutrientes por la que aquellos órganos, como el músculo o el tejido adiposo, que pueden utilizar otros combustibles en lugar de glucosa, desarrollan una resistencia a la insulina para dejar más glucosa disponible para otras funciones vitales (Bell y Bauman, 1997). El aumento de la hormona del crecimiento promueve resistencia a la insulina (Bell y Bauman, 1997), y se sabe que esta hormona se encuentra aumentada durante la subnutrición (Thissen y col., 1994), por lo que los mayores niveles de glucosa observados en las ovejas subnutridas del Artículo II podrían explicarse de esta manera. Podría especularse que como las ovejas subnutridas del Artículo IV tenían más reservas corporales que las del Artículo II, quizás no se dispararon estos mecanismos y por lo tanto no se observaron diferencias en las concentraciones de glucosa e insulina entre los grupos.

Un hallazgo interesante fue el aumento en el momento del celo de las concentraciones de metabolitos (glucosa y AGNE) y hormonas metabólicas (insulina e IGF-I), muy evidente en el grupo control y menos pronunciado en el grupo bajo. Este efecto podría deberse, por un lado, a una respuesta aguda de estrés frente a las prácticas de manejo inherentes a la detección de celos (retiro de esponjas, introducción de machos, presencia más constante de humanos). Estos factores estresantes podrían provocar la liberación refleja de insulina y glucagón, así como también una resistencia periférica a la insulina, resultando en una menor entrada de glucosa a las células (Elsasser y col., 2000). Por otra parte, el aumento de E2 propio del estro puede haber incrementado la secreción pancreática de insulina, como ha sido sugerido para ratas (Nadal y col., 1998; Morimoto y col., 2001). La sensibilidad del páncreas al E2 (en términos de su contenido de ER) también podría

haber estado aumentada en el celo como ocurre en otros tejidos diana de las hormonas esteroideas; por ejemplo, el aumento de ER en las adrenales durante la fase folicular de la oveja (van Lier y col., 2003). El aumento al estro del IGF-I, que también ha sido observado por otros autores (Spicer y col., 1993; Vinoles y col., 2005) podría ser explicado por el aumento de insulina, ya que en vacas se ha descrito que la insulina aumenta las concentraciones hepáticas del mRNA de IGF-I (Butler y col., 2003; Rhoads y col., 2004). Sin embargo, el aumento al estro de la glucosa no puede ser explicado por los aumentos de insulina, que es una hormona hipoglucemiente. Esta variación de metabolitos y hormonas metabólicas según el momento del ciclo sexual pone de manifiesto un nuevo aspecto de la relación nutrición-reproducción. Aunque la mayoría de los estudios se han centrado en los efectos de las señales metabólicas sobre el sistema reproductivo, a partir de estos hallazgos, el efecto contrario puede ser vislumbrado, y es posible que la comunicación entre nutrición y reproducción sea una relación de ida y vuelta, con las hormonas reproductivas dictando cambios metabólicos.

Efecto de la subnutrición y de la gestación sobre las concentraciones plasmáticas de 17 β -estradiol y progesterona

En el Artículo II, se observaron mayores concentraciones de P4 en días específicos del ciclo estral (ver Figura 6) y esto, junto con la tendencia a mayores concentraciones de E2 en las ovejas subnutridas, es consistente con la literatura (Williams y Cumming, 1982; Parr y col., 1987; Rhind y col., 1989b; Lozano y col., 1998; O'Callaghan y col., 2000b). Como se ha mencionado en la sección de *Nutrición y Reproducción* de la *Introducción*, no se ha observado que la producción *in vitro* de P4 por el CL sea afectada por la subnutrición (Abecia y col., 1995; 1997; 1999b) por lo que los mayores niveles plasmáticos de P4 no se explicarían por una mayor síntesis. Las mayores concentraciones de P4 plasmática probablemente se deban a una mayor metabolización hepática de la hormona más que a cambios en la tasa de secreción de la hormona por el CL, dado que las ovejas mejor nutridas presentaban hígados más pesados y un mayor flujo sanguíneo en la vena porta (Parr, 1992). Además, como los esteroides se almacenan selectivamente en el tejido adiposo, se ha sugerido que un régimen de alimentación que resulte en la lipólisis, llevará aparejado una liberación de esteroide almacenado (Boland y col., 2001).

Por otro lado, en el Artículo IV no se observaron diferencias entre tratamientos nutricionales en las concentraciones de P4. Esta contradicción con el experimento

anterior podría ser explicada por las diferencias entre los diseños experimentales que se mencionaron anteriormente. A pesar de que en ambos experimentos, los animales estuvieron sometidos al mismo grado de subnutrición (0,5M) y durante el mismo período (28 días), las ovejas del Artículo IV tuvieron mayores reservas corporales durante todo el experimento (ver Tabla 1). Una posible explicación es que las ovejas del Artículo IV quizá no experimentaron una reducción diferencial en su masa hepática y por lo tanto la metabolización de los esteroides pudo no verse afectada. Además, la pérdida de PV (movilización grasa) fue menor en las ovejas subnutridas de este experimento, por lo que la menor lipólisis pudo haber provocado una menor liberación de la P4 almacenada.

Efectos sobre la sensibilidad del tracto reproductivo a los estrógenos y la progesterona

Efecto de la subnutrición

La sensibilidad de un tejido a las hormonas depende del número y de la afinidad de los receptores de las hormonas correspondientes 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. En el momento de realizar esta tesis, no se conocía si el nivel nutricional afectaba la expresión de los receptores. El hallazgo más importante de esta tesis es que las ovejas presentan alteraciones en la expresión génica del tracto reproductivo en respuesta a la subnutrición. Se ha demostrado que las ovejas subnutridas presentan una sensibilidad reducida a los esteroides el día 5 del ciclo sexual: menor contenido endometrial de PR (Artículo I) y ER α (Artículo II), menor capacidad de unión de PR y ER endometriales (Artículo II) y menor expresión en los oviductos ipsilaterales al CL del mRNA de PR y ER α (Artículo III). La disminución en la expresión y la capacidad de unión del PR el día 5 en ovejas subnutridas, es coherente con la menor concentración endometrial de P4 encontrada en este día por Lozano y col., (1998), ya que los receptores concentran y retienen las hormonas específicas en los órganos diana (Clark y col., 1992). La ausencia de efecto de la subnutrición sobre los contenidos de PR los días 10 (Artículo I) y 14 (Artículos II y IV) es consistente con la ausencia de efecto sobre los contenidos de P4 endometrial los días 10 (Lozano y col., 1998) y 14 (Artículo IV).

Las hormonas esteroideas son esenciales para modular la fisiología de los oviductos 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. Estos resultados podrían explicar, al menos en parte, las menores tasas de gestación y el retraso en el desarrollo embrionario que se ha observado en las ovejas subnutridas (Rhind *y col.*, 1989c; Abecia *y col.*, 1997; Lozano *y col.*, 2003). Abecia *y col.*, (1995; 1997; 1999a) 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 comprometer su desarrollo en etapas posteriores (Leese, 2005). Nuestro 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, en un retraso en su desarrollo y/o en muerte embrionaria más allá del día 5, por ejemplo, los días 14 o 15 de gestación. Basados en nuestros resultados, no parece probable que la subnutrición afecte el ambiente materno en etapas más tardías del día 5 (i.e.: días 10 o 14), pero la alteración de la expresión génica uterina y de los oviductos durante la primera semana de gestación podría ser suficiente para determinar el fracaso de una nueva gestación.

¿Cómo disminuye la subnutrición los PR y los ER el día 5? Como la P4 ejerce un efecto inhibitorio sobre la expresión de PR, se podría proponer que las menores concentraciones de PR en las ovejas subnutridas se deben a las mayores concentraciones plasmáticas de P4 que sus controles. Sin embargo, éstas fueron mayores desde el día 5 y no tuvieron una historia previa inmediata de mayor influencia de P4, por lo que la expresión disminuida de PR probablemente no se deba a las concentraciones de P4. Teniendo esto en cuenta, en el Artículo I propusimos dos posibles vías por las cuales la expresión de PR podría verse afectada en las ovejas subnutridas, ambas mediadas por el IGF-I. El IGF-I plasmático que disminuye en las ovejas subnutridas (Hua *y col.*, 1995; Artículo II), estimula la función de ER α de una manera independiente del ligando (Flint *y col.*, 2002), y una menor función de ER α resultaría en un menor estímulo para la síntesis de PR. Por otro lado, el IGF-I estimula el crecimiento y la diferenciación de las células ováricas (Lucy *y col.*, 1999), y al estar disminuidas podrían resultar en una menor producción de E2 folicular, y por lo tanto, en un menor estímulo para la síntesis de PR. En el Artículo II, a pesar de que se observó que las concentraciones de E2 eran mayores en ovejas subnutridas (probablemente debido a la menor metabolización hepática), se encontró que la subnutrición provocaba una

disminución en la expresión del mRNA de ER α y en la capacidad de unión de los ER en general. Por lo tanto, es probable que la menor influencia estrogénica sea responsable de la menor expresión de PR en las ovejas subnutridas. El útero expresa los receptores de IGF-I (Stevenson y col., 1994), por lo que las menores concentraciones plasmáticas de IGF-I podrían explicar la menor capacidad de unión de los ER endometriales, y una menor acción estrogénica, por ejemplo, una menor activación de PR. Por otra parte, también se ha demostrado que la leptina es capaz de activar directamente al ER α (Catalano y col., 2004), y la leptina está disminuida en ovejas subnutridas (Artículos II y IV) por lo que esta otra vía no puede ser descartada.

La alteración de la expresión de los receptores esteroideos el día 5 en ovejas subnutridas podría afectar el ambiente uterino debido a una menor acción de la P4 y los E sobre el endometrio. Otro posible mecanismo por el que el ambiente uterino podría verse alterado puede ser una menor acción de factores de crecimiento que también cumplen una función esencial en la fisiología uterina. Se ha descrito que existe una "conversación cruzada" entre ER y algunos factores de crecimiento (i.e. IGF-I). En ratones, el ER α es necesario para que las células uterinas respondan al estímulo de IGF-I y se produzca la proliferación (Klotz y col., 2002). Teniendo en cuenta que la expresión de ER está afectada en las ovejas subnutridas, se podría especular que el ambiente uterino, además de tener una sensibilidad reducida a la acción de las hormonas esteroideas, tampoco recibe el estímulo adecuado por parte de los factores de crecimiento, pero este efecto no ha sido estudiado en el presente trabajo.

Efecto del día del ciclo sexual

En el grupo control, en general se observó una regulación "a la baja" en la expresión de receptores hacia la fase luteal tardía. La mayoría de los tipos celulares estudiados por inmunohistoquímica para PR en el Artículo I, y los estudiados para PR y ER α en el Artículo II, mostraron que el día 5 la expresión de los receptores es mayor que en los días 10 o 14. Esta disminución de la expresión de los receptores también se observó en las concentraciones de mRNA y en la capacidad de unión de ambos. Estos hallazgos coinciden con la clásica regulación de las hormonas esteroideas sobre sus propios receptores, con el E2 aumentando la expresión de ambos, y la P4 disminuyéndola (Clark y col., 1992). Las concentraciones uterinas de ER y PR son mayores alrededor del celo, bajo influencia estrogénica, y menores en la fase luteal, debido a la acción supresora de la progesterona (Miller y col., 1977; Cherny y col., 1991; Wathes y Hamon, 1993; Spencer y Bazer, 1995). En algunos casos se observó esta regulación dependiente del día del ciclo en el grupo control, pero no en el grupo bajo, y sugerimos que se debe a que en las ovejas

subnutridas las concentraciones de receptores ya se encontraban en niveles bajos el día 5 y debido a la menor sensibilidad a la P4, sus efectos no fueron observados. Esta regulación dependiente del momento del ciclo sexual no se observó en los oviductos, que presentaron similar expresión de mRNA para PR y ER α los días 5 y 14. Ulbrich *y col.*, (2003) también encontraron una expresión de receptores similar en las fases luteales temprana y tardía, aunque encontraron mayores concentraciones durante la fase folicular. No se puede descartar que hayan ocurrido cambios en la expresión de receptores en días previos a los estudiados en este experimento. De hecho, Rodríguez-Piñón *y col.*, (2005) demostraron que los cambios en respuesta al E2 son rápidos y transitorios en el oviducto, a diferencia del resto del tracto reproductivo donde se mantienen por más tiempo.

Efecto del tipo celular

La técnica de inmunohistoquímica permite conocer la localización tisular de las proteínas medidas, haciéndola una técnica única en este sentido. El hallazgo más consistente fue una mayor tinción para ER α en las glándulas profundas. El día 5, ambos receptores esteroideos se expresaron de diferente manera a lo largo de las glándulas, encontrándose en las glándulas superficiales mayor expresión de PR y menor de ER α (ver Figura 12). Sin embargo en el estroma, ambos receptores se expresaron más en el estroma superficial. El día 10, la tinción de PR y ER α fue relativamente pareja a lo largo de todo el endometrio, perdiéndose la diferencia entre epitelio glandular superficial y profundo, pero manteniéndose la diferencia en los estromas. El día 14, el patrón de expresión de PR en las glándulas cambió, porque hubo una desaparición casi total en el epitelio glandular superficial. La expresión de ER α , sin embargo, siguió más o menos el mismo patrón de expresión el día 14 que en el día 5, con menor expresión en el epitelio glandular superficial y en el estroma profundo.

Esta expresión diferencial de los receptores en los diferentes tipos celulares puede ser asociada con las diferentes funciones de las hormonas esteroideas: los E estimulan la proliferación de los epitelios uterinos, mientras que la P4 inhibe la proliferación inducida por los E y estimula la diferenciación celular (Cunha *y col.*, 2004). Además, cada hormona actúa en poblaciones celulares diferentes dentro de las glándulas endometriales (Conti *y col.*, 1984). Se ha determinado en útero de conejos, que el E2 actúa sobre células que no se están dividiendo (quiescentes) y que éstas se sitúan principalmente en la base de las glándulas. La P4, por su parte, actúa en células en la fase activa del ciclo celular (que se están dividiendo) y éstas se localizan más hacia la luz uterina (Conti *y col.*, 1984). La ubicación mayoritaria de los ER α en las glándulas profundas podría asociarse a un estímulo directo de la

proliferación desde la base de las glándulas. Actualmente estamos investigando si esta mayor expresión de ER α en el epitelio glandular profundo está asociada a una mayor expresión de un indicador de proliferación celular (antígeno nuclear de proliferación celular o PCNA). Como puede observarse en la Figura 12, las variaciones más drásticas en la expresión de los receptores se dan en el epitelio luminal y en las glándulas, mientras que el estroma parece mantener su expresión relativamente constante. De hecho, se ha demostrado en útero de ratas que el ER α del estroma es suficiente y necesario para que la mitogénesis y la secreción estimulada por los E pueda ocurrir en los epitelios, probablemente enviando la señal a través de factores de crecimiento actuando de forma paracrína (Cooke y col., 1998). Además, la respuesta del epitelio luminal a la P4 (inhibición de la proliferación inducida por los E) también está mediada por el PR del estroma (Kurita y col., 1998), por lo que la permanencia de los PR y ER α en el estroma podría tener una función sustentando las funciones de los epitelios. La importancia de las relaciones entre epitelio y estroma resalta la relevancia de estudiar la ubicación de los receptores en diferentes tipos celulares dentro del tejido.

Efecto de la subnutrición sobre el reconocimiento materno de la gestación

En el Artículo IV, el efecto de la subnutrición se evidenció de diferente manera según el estado fisiológico de los animales. En las ovejas cíclicas subnutridas se observó una tendencia hacia mayores contenidos de ER α en el epitelio luminal y una secreción endometrial de PGE2 disminuida el día 14 del ciclo (Artículo IV). La PGE2 tiene un efecto protector del CL, ya sea luteotrófico o antiluteolítico (Bazer y col., 1991). Es interesante el hallazgo de que el único cambio provocado por la subnutrición en la secreción de PGs se observó en ovejas cíclicas (menor secreción de PGE2 antiluteolítica) y que en el tipo celular responsable de la luteólisis (e.g., epitelio luminal) hubiera una tendencia a una mayor expresión de ER α (cuyo aumento en este momento del ciclo es necesario para que se desencadene la luteólisis); es decir, en las ovejas cíclicas subnutridas se observa un debilitamiento de los mecanismos luteotrópicos y una potenciación de los luteolíticos. Esto no se observó en las ovejas gestantes subnutridas, en las cuales no se observaron diferencias en la secreción de PGE2 endometrial ni en la expresión epitelial de ER α .

En cuanto a IFNAR2, aunque no se observaron diferencias entre ovejas subnutridas y controles (tanto cíclicas como gestantes) en ningún tipo celular, sí se observó un patrón de expresión diferente frente al tratamiento nutricional entre cíclicas y gestantes. En las glándulas y el estroma del grupo control, las ovejas cíclicas presentaron mayor expresión del IFNAR2 que las ovejas gestantes, mientras que

esta diferencia no se observó en el grupo bajo. Por el contrario, las ovejas cíclicas de este grupo presentaron mayor expresión de IFNAR2 que las gestantes en el epitelio luminal, donde no se observaron diferencias en el grupo control. Aunque es difícil interpretar estos resultados, es claro que hay una alteración del patrón de expresión de IFNAR2, es decir, de la sensibilidad al IFN τ , en respuesta a la subnutrición. La activación de la cascada de señalización intra-celular del IFN τ 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 τ , es el responsable de la inhibición en la síntesis del ER y el OTR (Spencer y col., 1998). En las ovejas gestadas subnutridas, los menores 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 no se encontraron modificaciones marcadas en la expresión de los receptores esteroideos en el día 14 de gestación debidos a la subnutrición, ni de OTR, IFNAR2 y COX-2, o de la secreción de PGs por el útero. Esta ausencia de efecto de la subnutrición sobre la expresión de factores implicados en el reconocimiento materno de la gestación, es consistente con las similares tasas de gestación encontradas entre las ovejas controles y las subnutridas del Artículo IV. Parece ser que los embriones de las ovejas subnutridas de este experimento lograron señalizar a la madre de manera adecuada y por eso no se observaron cambios en la expresión génica endometrial el día 14 de la gestación.

Las tasas de gestación similares entre ovejas subnutridas y controles del Artículo IV contrastan con lo observado por Abecia y col., (1995; 1999a) en experimentos con el mismo nivel de subnutrición (mitad de los requerimientos para el mantenimiento) los días 14 y 15. Si bien el número de animales utilizado en estos experimentos puede no ser suficiente para el estudio de este tipo de variables, la diferencia en cuanto a tasas de gestación podría ser explicada en base al estado metabólico de los animales en uno y otros experimentos. Es importante destacar que en el Artículo IV, el PV y la CC de los animales fueron alrededor de un 20% superiores que en los experimentos de Abecia y col., (1995; 1999a). En ovinos, el estado metabólico previo influencia la respuesta de los animales a un cambio en la disponibilidad de energía (Blache y col., 2006). En moruecos, el suplemento nutricional aumentó las concentraciones de LH en animales mantenidos en una CC baja, pero no las afectó en aquellos mantenidos en una CC alta, sugiriendo que el estado de las reservas corporales afecta la respuesta del sistema reproductivo a los cambios nutricionales (Zhang y col., 2005). Nuestro grupo ha demostrado

previamente que ovejas lactantes alimentadas a la mitad de los requerimientos para el mantenimiento pero con una alta CC al parto ($> 2,75$) presentan períodos de anestro posparto similares a las ovejas controles, mientras que las ovejas subnutridas con baja CC al parto ($< 2,75$), presentan anestros más largos (45 vs. 36 días) y pesos de corderos al destete menores (Sosa y col., 2006). Asimismo, ovejas con CC bajas presentan anestros estacionales más prolongados que ovejas con alta CC (Forcada y col., 1992). Como ha sido mencionado en la *Introducción*, estos efectos podrían ser el reflejo de la acción de varias hormonas metabólicas que son consideradas mediadoras entre el estado metabólico del animal y su actividad reproductiva. La respuesta del organismo a la leptina, por ejemplo, puede depender de la historia metabólica reciente (nivel de nutrición, efecto dinámico) pero también a una más antigua (reservas corporales, efecto estático), lo cual ha sido llamado "memoria metabólica" (Chilliard y col., 2005; Blache y col., 2006). Esto resalta la importancia de tener en cuenta las reservas corporales previas de los animales a la hora de comparar los efectos dinámicos de la nutrición sobre las funciones reproductivas.

Por los resultados surgidos de los experimentos de esta tesis no parece probable que el menor desarrollo embrionario y las menores tasas de gestación que otros autores han observado en ovejas subnutridas se deba a alteraciones de la fisiología uterina en etapas tardías de la gestación temprana (i.e. días 10 o 14). Sin embargo, dado que el nivel de CC en el cual fue observada la disminución en la sensibilidad endometrial a los esteroides en los Artículos I y II no fue alcanzado en el Artículo IV, no puede descartarse que si se hubieran alcanzado tales niveles, se hubieran observado efectos también a nivel del mecanismo de reconocimiento materno de la gestación.

CONCLUSIONES

En las condiciones en las que se han realizado las experiencias de la presente tesis doctoral, puede concluirse lo siguiente:

- En ovejas cíclicas, un nivel de subnutrición que proporciona la mitad de los requerimientos para mantenimiento provoca una disminución en la intensidad de tinción por inmunohistoquímica de PR y ER α en la mayoría o algunos tipos celulares respectivamente y en la capacidad de unión de ambos receptores el día 5 del ciclo sexual pero no los días 10 o 14 (*Artículos I, II y IV*). La subnutrición modifica la concentración de los transcriptos de ER α el día 5 del ciclo, y de PR en los días 5 y 14, en el oviducto ipsilateral al CL (*Artículo III*), pero no se encontraron diferencias en la concentración de transcriptos del cuerno uterino ipsilateral al CL (*Artículo II*).
- En el momento del celo se produce un aumento en las concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina e IGF-I, menos pronunciado en las ovejas subnutridas (*Artículos II y IV*), develando de esta manera un nuevo aspecto de la relación entre la nutrición y la reproducción, con las hormonas reproductivas influenciando el metabolismo.
- La subnutrición no presentó un efecto en la secreción *in vitro* de PGF2 α en ovejas cíclicas y gestantes, ni provoca cambios notorios en la expresión endometrial de PR, ER α , OTR, IFNAR2 y COX-2 en ovejas cíclicas o gestantes determinados por inmunohistoquímica el día 14 del ciclo estral o de la gestación (*Artículo IV*).
- La gestación provoca una disminución en la secreción *in vitro* de PGF2 α tanto en ovejas subnutridas como controles (*Artículo IV*) y en la expresión de IFNAR2 en las glándulas y el estroma de ovejas controles, sin cambios en la expresión en el epitelio luminal (*Artículo IV*).
- El endometrio de las ovejas cíclicas subnutridas secreta menos PGE2 que el de las ovejas controles el día 14 del ciclo sexual. No se observó efecto de la subnutrición en este parámetro en las ovejas gestantes (día 14) (*Artículo IV*).

CONSIDERACIONES FINALES

El principal hallazgo de la presente tesis es que la subnutrición afecta el ambiente en el que podría desarrollarse un posible embrión ovino el día 5, alterando la expresión génica de los oviductos y del endometrio. De acuerdo a nuestros resultados, no parece probable que existan alteraciones en el ambiente uterino en etapas más tardías (i.e.: días 10 o 14). Un ambiente inadecuado para el embrión de reciente formación podría determinar un retraso en el desarrollo embrionario e incluso su muerte. Si al día 14, el embrión ha sido exitoso en sintetizar concentraciones de IFN τ adecuadas como parece haber sido el caso de los embriones de ovejas subnutridas (no se observaron diferencias en la tasa de gestación entre ovejas subnutridas y controles), entonces señalizará adecuadamente a su madre de su presencia y por ende, no es esperable encontrar grandes cambios en la expresión génica endometrial. Nuestros resultados son consistentes en señalar cambios muy tempranos en la expresión de PR y ER α en el oviducto y el útero posiblemente mediados por las modificaciones endocrinas provocadas por la subnutrición. Una nueva hipótesis que surge de estos hallazgos es que se deberían encontrar alteraciones tempranas (anteriores al día de reconocimiento materno) en la expresión de factores de crecimiento, promotores del desarrollo embrionario. En ese sentido, los pasos a seguir luego de esta tesis son el estudio de la síntesis de IGF-I e IGF-II por parte del endometrio, y la sensibilidad del endometrio a estos factores (expresión de IGF-IR).

Por otro lado, la ausencia de efecto de la subnutrición sobre la tasa de gestación que se observó en el Artículo IV de esta tesis, y su discrepancia con hallazgos previos de nuestro grupo (Abecia y col., 1995; 1999a), dan lugar a una nueva línea de investigación sobre los efectos estáticos y dinámicos del estado metabólico sobre la expresión génica uterina en ovinos, que confirmen nuestra hipótesis sobre la importancia del estado de reservas previo al inicio de la subnutrición.

La complejidad de los mecanismos subyacentes a los procesos de desarrollo embrionario y reconocimiento materno de la gestación, y de la relación entre el estado metabólico y estos procesos, hacen que los hallazgos de esta tesis, si bien son importantes *per se*, impliquen un punto de partida para futuros estudios de los efectos de la subnutrición sobre el ambiente del embrión. El comprender las bases moleculares de las alteraciones de los procesos fisiológicos, podría contribuir en un futuro, a desarrollar estrategias para evitarlos y mejorar las tasas de supervivencia embrionaria, y por ende, la eficiencia en la producción ovina.

REFERENCIAS

- Abecia, J.A., Rhind, S.M., Bramley, T.A., 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., 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., 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**, 209-18.
- Abecia, J.A., Forcada, F., Lozano, J.M. (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.
- Abecia, J.A., Lozano, J.M., Forcada, F. (1999b). A preliminary study on the effects of dietary energy and melatonin on the ex vivo production of progesterone and prostaglandin F2a by the corpora lutea and endometrial tissue of ewes. *Veterinary Research Communications* **23**, 115-121.
- Abecia, J.A., Sosa, C., Forcada, F., Meikle, A. (2006). The effect of undernutrition on the establishment of pregnancy in the ewe. *Reprod Nutr Dev* **46**, 367-78.
- Adam, C.L., Findlay, P.A., Kyle, C.E., Young, P. (1998). Effect of restricted nutrition on timing of puberty in female Soay Sheep. *J Reprod Fertil* **112**, 31-37.
- Afrc (1993) 'Energy and protein requirements of ruminants. An advisor manual prepared by the AFRC technical committee on responses to nutrients.' (CAB International: Wallingford, UK).
- Arosh, J.A., Banu, S.K., Kimmins, S., Chapdelaine, P., Maclare, 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**, 5280-93.
- Ashley, R.L., Clay, C.M., Farmerie, T.A., Niswender, G.D., Nett, T.M. (2006). Cloning and Characterization of an Ovine Intracellular Seven Transmembrane Receptor for Progesterone that Mediates Calcium Mobilization. *Endocrinology* **147**, 4151-4159.
- Ashworth, C.J., Bazer, F.W. (1989). Changes in ovine conceptus and endometrial function following asynchronous embryo transfer or administration of progesterone. *Biol Reprod* **40**, 425-33.
- Ashworth, C.J. (1995). Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. *Livestock Production Science* **44**, 99-105.

Asselin, E., Drolet, P., Fortier, M.A. (1997a). Cellular Mechanisms Involved during Oxytocin-Induced Prostaglandin F2 α Production in Endometrial Epithelial Cells in Vitro: Role of Cyclooxygenase-2. *Endocrinology* **138**, 4798-4805.

Asselin, E., Lacroix, D., Fortier, M.A. (1997b). IFN-tau increases PGE2 production and COX-2 gene expression in the bovine endometrium in vitro. *Mol Cell Endocrinol* **132**, 117-26.

Auger, A.P. (2001). Ligand-independent activation of progestin receptors: relevance for female sexual behaviour. *Reproduction* **122**, 847-55.

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

Bassett, J.M., Weston, R.H., Hogan, J.P. (1971). Dietary regulation of plasma insulin and growth hormone concentrations in sheep. *Aust J Biol Sci* **24**, 321-30.

Bathgate, R.A., Tillmann, G., Ivell, R. (1998). Molecular mechanisms of bovine oxytocin receptor gene regulation. *Biology of Reproduction* **58**, 160.

Bazer, F.W., Thatcher, W.W., Hansen, P.J., Mirando, M.A., Ott, T.L., Plante, C. (1991). Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl* **43**, 39-47.

Bazer, F.W., Spencer, T.E., Ott, T.L. (1997). Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. *Am J Reprod Immunol* **37**, 412-20.

Bell, A.W., Bauman, D.E. (1997). Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **2**, 265-78.

Blache, D., Tellam, R.L., Chagas, L.M., Blackberry, M.A., Vercoe, P.E., Martin, G.B. (2000). Level of nutrition affects leptin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. *J Endocrinol* **165**, 625-37.

Blache, D., Zhang, S., Martin, G.B. (2006). Dynamic and integrative aspects of the regulation of reproduction by metabolic status in male sheep. *Reprod Nutr Dev* **46**, 379-90.

Boland, M.P., Lonergan, P., O'callaghan, D. (2001). Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* **55**, 1323-1340.

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. *Animal Reproduction Science* **44**, 11-21.

Braunsberg, H. (1984). Mathematical analysis of data from receptor assays. *Recent Results Cancer Res* **91**, 18-31.

Brien, F.D., Cumming, I.A., Clarke, I.J., Cocks, C.S. (1981). Role of plasma progesterone concentration in early-pregnancy of the ewe. *Aust J Exp Agr* **21**, 562-565.

Buchbinder, A., Lang, U., Baker, R.S., Khoury, J.C., Mershon, J., Clark, K.E. (2001). Leptin in the ovine fetus correlates with fetal and placental size. *Am J Obstet Gynecol* **185**, 786-91.

- Budak, E., Fernandez Sanchez, M., Bellver, J., Cervero, A., Simon, C., Pellicer, A. (2006). Interactions of the hormones leptin, ghrelin, adiponectin, resistin, and PYY3-36 with the reproductive system. *Fertil Steril* **85**, 1563-81.
- Buhi, W.C., Alvarez, I.M., Kouba, A.J. (1997). Oviductal regulation of fertilization and early embryonic development. *J Reprod Fertil Suppl* **52**, 285-300.
- Buhi, W.C. (2002). Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* **123**, 355-62.
- Burns, P.D., Tsai, S.J., Wiltbank, M.C., Hayes, S.H., Graf, G.A., Silvia, W.J. (1997). Effect of Oxytocin on Concentrations of Prostaglandin H Synthase-2 mRNA in Ovine Endometrial Tissue in Vivo. *Endocrinology* **138**, 5637-5640.
- Butler, S.T., Marr, A.L., Pelton, S.H., Radcliff, R.P., Lucy, M.C., Butler, W.R. (2003). Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *J Endocrinol* **176**, 205-17.
- Butler, W.R. (2003). Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science* **83**, 211-218.
- Catalano, S., Mauro, L., Marsico, S., Giordano, C., Rizza, P., Rago, V., Montanaro, D., Maggiolini, M., Panno, M.L., Ando, S. (2004). Leptin induces, via ERK1/ERK2 signal, functional activation of estrogen receptor alpha in MCF-7 cells. *J Biol Chem* **279**, 19908-15.
- Clark, J.H., Schrader, W.T., O'malley, B.W. (1992) Mechanisms of steroid hormones action. In 'Textbook of Endocrinology'. (Eds Wilson, J.D. y Foster, D.W.) pp. 35-90. (W B Saunders: Philadelphia).
- Clark, J.H., Mani, S.K. (1994) Actions of ovarian steroid hormones. In 'The Physiology of Reproduction'. (Eds Knobil, E. y Neill, J.D.) pp. 1011-1046. (Raven Press: New York).
- Conneely, O.M., Mulac-Jericevic, B., Lyndon, J.P., Mayo, F.D. (2001). Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. *Mol Cell Endocrinol* **179**, 97-103.
- Conti, C.J., Gimenez-Conti, I.B., Conner, E.A., Lehman, J.M., Gerschenson, L.E. (1984). Estrogen and progesterone regulation of proliferation, migration, and loss in different target cells of rabbit uterine epithelium. *Endocrinology* **114**, 345-51.
- Cooke, P.S., Buchanan, D.L., Db, D.B.L., Cunha, G.R. (1998). Mechanism of estrogen action: lessons from the estrogen receptor- α knockout mouse. *Biol Reprod* **59**, 470-475.
- Cunha, G.R., Young, P., Brody, J.R. (1989). Role of uterine epithelium in the development of myometrial smooth muscle cells. *Biology of Reproduction* **40**, 861-871.
- Cunha, G.R., Cooke, P.S., Kurita, T. (2004). Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol* **67**, 417-34.

Charpigny, G., Reinaud, P., Tamby, J.P., 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**, 2163-71.

Cherny, R.A., Salamonsen, L.A., Findlay, J.K. (1991). Immunocytochemical localization of oestrogen receptors in the endometrium of the ewe. *Reproduction, Fertility and Development* **3**, 321-331.

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.

Chilliard, Y., Ferlay, A., Faulconnier, Y., Bonnet, M., Rouel, J., Bocquier, F. (2000). Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. *Proc Nutr Soc* **59**, 127-34.

Chilliard, Y., Bonnet, M., Delavaud, C., Faulconnier, Y., Leroux, C., Djiane, J., Bocquier, F. (2001). Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domest Anim Endocrinol* **21**, 271-95.

Chilliard, Y., Delavaud, C., Bonnet, M. (2005). Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest Anim Endocrinol* **29**, 3-22.

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

Diskin, M.G., Mackey, D.R., Roche, J.F., Sreenan, J.M. (2003). Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science* **78**, 345-370.

Domanski, P., Colamonti, O.R. (1996). The type-I interferon receptor. The long and short of it. *Cytokine Growth Factor Rev* **7**, 143-51.

Downing, J.A., Joss, J., Scaramuzzi, R.J. (1995). Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophins and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrous cycle. *J Endocrinol* **146**, 403-10.

Dunlap, K.A., Stormshak, F. (2004). Nongenomic Inhibition of Oxytocin Binding by Progesterone in the Ovine Uterus. *Biol Reprod* **70**, 65-69.

Einer-Jensen, N., Mccracken, J.A. (1981). The transfer of progesterone in the ovarian vascular pedicle of the sheep. *Endocrinology* **109**, 685-90.

Elsasser, T.H., Klasing, K.C., Filipov, N., Thompson, F. (2000) The metabolic consequences of stress: targets for stress and priorities of nutrient use. In 'The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare'. (Eds Moberg, G.P. y Mench, J.A.) pp. 77-110. (CAB International: Oxon, UK).

Farin, C.E., Imakawa, K., Roberts, R.M. (1989). In situ localization of mRNA for the interferon, ovine trophoblast protein-1, during early embryonic development of the sheep. *Mol Endocrinol* **3**, 1099-107.

Farin, C.E., Imakawa, K., Hansen, T.R., Mcdonnell, J.J., Murphy, C.N., Farin, P.W., Roberts, R.M. (1990). Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. *Biol Reprod* **43**, 210-8.

- Fawcett, D.W. (1988) Sistema reproductor femenino. In 'Tratado de histología' pp. 909-912. (Interamericana-McGraw Hill: Madrid).
- Fleming, T.P., Kwong, W.Y., Porter, R., Ursell, E., Fesenko, I., Wilkins, A., Miller, D.J., Watkins, A.J., Eckert, J.J. (2004). The embryo and its future. *Biol Reprod* **71**, 1046-54.
- Flint, A.P.F., Sheldrick, E.L., Fisher, P.A. (2002). Ligand-independent activation of steroid receptors. *Domestic Animal Endocrinology* **23**, 13-24.
- Forcada, F., Abecia, J.A., Sierra, I. (1992). Seasonal changes in oestrus activity and ovulation rate in Rasa Aragonesa ewes maintained at different body condition levels. *Small Ruminant Research* **8**, 313-324.
- Foster, D.L., Olster, D.H. (1985). Effect of restricted nutrition on puberty in the lamb: patterns of tonic luteinizing hormone (LH) secretion and competency of the LH surge system. *Endocrinology* **116**, 375-381.
- Foster, D.L., Ebling, F.J., Micka, A.F., Vannerson, L.A., Bucholtz, D.C., Wood, R.I., Suttie, J.M., Fenner, D.E. (1989). Metabolic interfaces between growth and reproduction. I. Nutritional modulation of gonadotropin, prolactin, and growth hormone secretion in the growth-limited female lamb. *Endocrinology* **125**, 342-350.
- Gandolfi, F., Brevini, T.A., Moor, R.M. (1989). Effect of oviduct environment on embryonic development. *J Reprod Fertil Suppl* **38**, 107-15.
- Garofalo, E.G., Tasende, C. (1996). Uterine estrogen and progesterone receptors in prepubertal ewes: distribution in myometrium, endometrium and caruncles. *Vet Res* **27**, 177-3.
- Geisert, R.D., Morgan, G.L., Short, E.C., Jr., Zavy, M.T. (1992). Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. *Reprod Fertil Dev* **4**, 301-5.
- Geisert, R.D., Pratt, T.N., Bazer, F.W., Mayes, J.S., Watson, G.H. (1994). Immunocytochemical localization and changes in endometrial progestin receptor protein during the porcine oestrous cycle and early pregnancy. *Reproduction, Fertility and Development* **6**, 749-760.
- Gimpl, G., Fahrenholz, F. (2001). The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation. *Physiol. Rev.* **81**, 629-683.
- Gluckman, P.D., Johnson-Barrett, J.J., Butler, J.H., Edgar, B.W., Gunn, T.R. (1983). Studies of insulin-like growth factor -I and -II by specific radioligand assays in umbilical cord blood. *Clin Endocrinol (Oxf)* **19**, 405-13.
- Godkin, J.D., Bazer, F.W., Moffatt, J., Sessions, F., Roberts, R.M. (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.
- Goff, A.K. (2002). Embryonic signals and survival. *Reprod Domest Anim* **37**, 133-9.
- Goff, A.K. (2004). Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle. *Biol Reprod* **71**, 11-6.

González, R.R., Caballero-Campo, P., Jasper, M., Mercader, A., Devoto, L., Pellicer, A., Simon, C. (2000). Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 4883-8.

Goodman, R.L. (1994) Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In 'The Physiology of Reproduction'. (Eds Knobil, E. y Neill, J.D.) pp. 659-709. (Raven Press: New York).

Graham, J.D., Clarke, C.L. (1997). Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. *Endocr Rev* **18**, 502-519.

Gray, C.A., Bartol, F.F., Taylor, K.M., Wiley, A.A., Ramsey, W.S., Ott, T.L., Bazer, F.W., Spencer, T.H. (2000). Ovine uterine gland knock-out model: effects of gland ablation on the estrous cycle. *Biol Reprod* **62**, 448-456.

Gray, C.A., Bartol, F.F., Tarleton, B.J., Wiley, A.A., Johnson, G.A., Bazer, F.W., Spencer, T.E. (2001). Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod* **65**, 1311-23.

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. *Biol Cell* **68**, 205-11.

Hafez, E.S. (1996) Anatomía del aparato reproductor femenino. In 'Reproducción e inseminación artificial en animales' pp. 20-52. (Interamericana-McGraw Hill: Madrid).

Hansen, T.R., Imakawa, K., Polites, H.G., Marotti, K.R., Anthony, R.V., Roberts, R.M. (1988). Interferon RNA of embryonic origin is expressed transiently during early pregnancy in the ewe. *J Biol Chem* **263**, 12801-4.

Harada, H., Takahashi, E., Itoh, S., Harada, K., Hori, T.A., 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**, 1500-9.

Hua, K.M., Hodgkinson, S.C.S., Bass, J.J. (1995). Differential regulation of plasma levels of insulin-like growth factors-I and -II by nutrition, age and growth hormone treatment in sheep. *Journal of Endocrinology* **147**, 507-516.

Imakawa, K., Anthony, R.V., Kazemi, M., Marotti, K.R., Polites, H.G., Roberts, R.M. (1987). Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. *Nature* **330**, 377-9.

Ivell, R., Kimura, T., Muller, D., Augustin, K., Abend, N., Bathgate, R., Telgmann, R., Balvers, M., Tillmann, G., Fuchs, A.R. (2001). The structure and regulation of the oxytocin receptor. *Exp Physiol* **86**, 289-96.

Johnson, G.A., Burghardt, R.C., Spencer, T.E., Newton, G.R., Ott, T.L., Bazer, F.W. (1999). Ovine osteopontin: II. Osteopontin and alpha(v)beta(3) integrin expression in the uterus and conceptus during the periimplantation period. *Biol Reprod* **61**, 892-9.

Johnson, M.M., Peters, J.P. (1993). Technical note: an improved method to quantify nonesterified fatty acids in bovine plasma. *Journal of Animal Science* **71**, 753-756.

- Kakar, M.A., Maddocks, S., Lorimer, M.F., Kleemann, D.O., Rudiger, S.R., Hartwich, K.M., Walker, S.K. (2005). The effect of peri-conception nutrition on embryo quality in the superovulated ewe. *Theriogenology* **64**, 1090-1103.
- Kawamura, K., Sato, N., Fukuda, J., Kodama, H., Kumagai, J., Tanikawa, H., Nakamura, A., Tanaka, T. (2002). Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology* **143**, 1922-31.
- Kaye, P.L. (1997). Preimplantation growth factor physiology. *Rev Reprod* **2**, 121-7.
- Killian, G.J. (2004). Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci* **82-83**, 141-53.
- Kleemann, D.O., Walker, S.K. (2005). Fertility in South Australian commercial Merino flocks: sources of reproductive wastage. *Theriogenology* **63**, 2075-2088.
- Klotz, D.M., Hewitt, S.C., Ciana, P., Ravisconi, M., Lindzey, J.K., Foley, J., Maggi, A., Diaugustine, R.P., Korach, K.S. (2002). Requirement of estrogen receptor-alpha in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk. *J Biol Chem* **277**, 8531-7.
- Kuiper, G.G.J.M., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.-A. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *PNAS* **93**, 5925-5930.
- Kurita, T., Young, P., Brody, J.R., Lydon, J.P., O'malley, B.W., Cunha, G.R. (1998). Stromal progesterone receptors mediate the inhibitory effects of progesterone on estrogen-induced uterine epithelial cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* **139**, 4708-13.
- Langer, J.A., Pestka, S. (1988). Interferon receptors. *Immunol Today* **9**, 393-400.
- Leese, H.J. (1995). Metabolic control during preimplantation mammalian development. *Hum Reprod Update* **1**, 63-72.
- Leese, H.J., Tay, J.I., Reischl, J., Downing, S.J. (2001). Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction* **121**, 339-46.
- Leese, H.J. (2005). Rewards and risks of human embryo creation: a personal view. *Reprod Fertil Dev* **17**, 387-91.
- Lindsay, D., Martin, G., Williams, I. (1993) Nutrition and reproduction. In 'Reproduction in Domesticated Animals' pp. 459-491. (Elsevier Science: Amsterdam).
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75.
- Lozano, J.M., Abecia, J.A., Forcada, F., Zarazaga, L., 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., 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.

Lucy, M.C., Bilby, C.R., Kirby, C.J., Yuan, W., Boyd, C.K. (1999). Role of growth hormone in development and maintenance of follicles and corpora lutea. *J Reprod Fertil Suppl* **54**, 49-59.

Martal, J., Chene, N., Camous, S., Huynh, L., Lantier, F., Hermier, P., L'haridon, R., Charpigny, G., Charlier, M., Chaouat, G. (1997). Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN-tau and other cytokines in early pregnancy. *Reprod Fertil Dev* **9**, 355-80.

Martin, G.B. (1995). Reproductive research on farm animals for Australia -some long-distance goals. *Reproduction, Fertility and Development* **7**, 967-982.

McCracken, J.A., Custer, E.E., Lamsa, J.C. (1999). Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* **79**, 263-323.

Mcneilly, A.S., Jonassen, J.A., Rhind, S.M. (1987). Reduced ovarian follicular development as a consequence of low body condition in ewes. *Acta Endocrinol (Copenh)* **115**, 75-83.

Meikle, A., Tasende, C., Rodriguez, M., Garofalo, E.G. (1997). Effects of estradiol and progesterone on the reproductive tract and on uterine sex steroid receptors in female lambs. *Theriogenology* **48**, 1105-13.

Meikle, A., Bielli, A., Masironi, B., Pedrana, G., Wang, H., Forsberg, M., Sahlin, L. (2000a). 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., Forsberg, M., Sahlin, L., Masironi, B., Tasende, C., Rodriguez-Pinon, M., Garofalo, E.G. (2000b). A biphasic action of estradiol on estrogen and progesterone receptor expression in the lamb uterus. *Reprod Nutr Dev* **40**, 283-293.

Meikle, A., Tasende, C., Sosa, C., Garofalo, E.G. (2004). The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. *Reprod Fertil Dev* **16**, 385-94.

Miller, B.G., Murphy, L., Stone, G.M. (1977). Hormone receptor levels and hormone, RNA and protein metabolism in the genital tract during the oestrous cycle of the ewe. *Journal of Endocrinology* **73**, 91-98.

Mogensen, K.E., Lewerenz, M., Reboul, J., Lutfalla, G., Uze, G. (1999). The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J Interferon Cytokine Res* **19**, 1069-98.

Moor, R.M., Rowson, L.E. (1966a). Local maintenance of the corpus luteum in sheep with embryos transferred to various isolated portions of the uterus. *J Reprod Fertil* **12**, 539-50.

Moor, R.M., Rowson, L.E. (1966b). The corpus luteum of the sheep: effect of the removal of embryos on luteal function. *J Endocrinol* **34**, 497-502.

Moor, R.M., Rowson, L.E. (1966c). The corpus luteum of the sheep: functional relationship between the embryo and the corpus luteum. *J Endocrinol* **34**, 233-9.

Moor, R.M., Rowson, L.E., Hay, M.F., Caldwell, B.V. (1969). The corpus luteum of the sheep: effect of the conceptus on luteal function at several stages during pregnancy. *J Endocrinol* **43**, 301-7.

- Morimoto, S., Cerbon, M.A., Alvarez-Alvarez, A., Romero-Navarro, G., Diaz-Sanchez, V. (2001). Insulin gene expression pattern in rat pancreas during the estrous cycle. *Life Sci* **68**, 2979-85.
- Morrison, A.G., Callanan, J.J., Evans, N.P., Aldridge, T.C., Sweeney, T. (2003). Effects of endocrine disrupting compounds on the pathology and oestrogen receptor alpha and beta distribution in the uterus and cervix of ewe lambs. *Domest Anim Endocrinol* **25**, 329-43.
- Moschos, S., Chan, J.L., Mantzoros, C.S. (2002). Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril* **77**, 433-44.
- Muñoz-Gutiérrez, M., Findlay, P.A., Adam, C.L., Wax, G., Campbell, B.K., Kendall, N.R., Khalid, M., Forsberg, M., Scaramuzzi, R.J. (2005). The ovarian expression of mRNAs for aromatase, IGF-I receptor, IGF-binding protein-2, -4 and -5, leptin and leptin receptor in cycling ewes after three days of leptin infusion. *Reproduction* **130**, 869-81.
- 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. (1995). Epithelial lining of the sheep ampulla oviduct undergoes pregnancy-associated morphological changes in secretory status and cell height. *Biol Reprod* **53**, 653-63.
- Murray, M.K., Desouza, M.M., Messinger, S.M. (1995). Oviduct during early pregnancy: hormonal regulation and interactions with the fertilized ovum. *Microsc Res Tech* **31**, 497-506.
- Nadal, A., Rovira, J.M., Laribi, O., Leon-Quinto, T., Andreu, E., Ripoll, C., Soria, B. (1998). Rapid insulinotropic effect of 17beta-estradiol via a plasma membrane receptor. *Faseb J* **12**, 1341-8.
- Nadal, A., Ropero, A.B., Fuentes, E., Soria, B., Ripoll, C. (2004). Estrogen and xenoestrogen actions on endocrine pancreas: from ion channel modulation to activation of nuclear function. *Steroids* **69**, 531-6.
- Nancarrow, C.D., Hill, J.L. (1995). Oviduct proteins in fertilization and early embryo development. *J Reprod Fertil Suppl* **49**, 3-13.
- Niswender, G.D., Nett, T.M. (1994) Corpus luteum and its control in infraprimate species. In 'The Physiology of Reproduction'. (Eds Knobil, E. y Neill, J.D.) pp. 781-816. (Raven Press: New York).
- O'callaghan, D., Boland, M.P. (1999). Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Animal Science* **68**, 299-314.
- O'callaghan, D., Lozano, J.M., Fahey, J., Gath, V., Snijders, S., Boland, M.P. (2000a). Recent developments in the effect of nutrition on fertility in dairy cows. *Irish Veterinary Journal* **53**, 417-426.
- O'callaghan, D., Yaakub, H., Hyttel, P., Spicer, L.J., Boland, M.P. (2000b). Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* **118**, 303-313.

Parr, R.A., Davis, I.F., Fairclough, R.J., Miles, M.A. (1987). Overfeeding during early pregnancy reduces peripheral progesterone concentration and pregnancy rate in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility* **80**, 317-320.

Parr, R.A. (1992). Nutrition-progesterone interactions during early pregnancy in sheep. *Fertility and Development* **4**, 297-300.

Peura, T.T., Kleemann, D.O., Rudiger, S.R., Nattrass, G.S., McLaughlan, C.J., Walker, S.K. (2003). Effect of Nutrition of Oocyte Donor on the Outcomes of Somatic Cell Nuclear Transfer in the Sheep. *Biol Reprod* **68**, 45-50.

Revelli, A., Massobrio, M., Tesarik, J. (1998). Nongenomic Actions of Steroid Hormones in Reproductive Tissues. *Endocr Rev* **19**, 3-17.

Reynolds, T.S., Stevenson, K.R., Wathes, D.C. (1997). Pregnancy-specific alterations in the expression of the insulin-like growth factor system during early placental development in the ewe. *Endocrinology* **138**, 886-97.

Rhind, S.M., Martin, G.B., Mcmillen, S., Tsonis, C.G., Mcneilly, A.S. (1989a). Effect of level of food intake of ewes on the secretion of LH and FSH and on the pituitary response to gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes. *J Endocrinol* **121**, 325-30.

Rhind, S.M., Mckelvey, W.A.C., Mcmillen, S., Gunn, R.G., Elston, D.A. (1989b). Effect of restricted food-intake, before and or after mating, on the reproductive performance of greyface ewes. *Animal Production* **48**, 149-155.

Rhind, S.M., Mcmillen, S., Wetherill, G.Z., Mckelvey, W.A.C., Gunn, R.G. (1989c). Effects of low levels of food intake before and/or after mating on gonadotrophin and progesterone profiles in Greyface ewes. *Animal Production* **49**, 267-273.

Rhind, S.M. (1992) Nutrition: its effect on reproductive performance and its control in female sheep and goats. In 'Progress in sheep and goat research'. (Ed. Speedy, A.W.) pp. 25-52. (CAB International: Wallingford).

Rhoads, R.P., Kim, J.W., Leury, B.J., Baumgard, L.H., Segoale, N., Frank, S.J., Bauman, D.E., Boisclair, Y.R. (2004). Insulin increases the abundance of the growth hormone receptor in liver and adipose tissue of periparturient dairy cows. *J Nutr* **134**, 1020-7.

Roberts, R.M. (1989). Conceptus interferons and maternal recognition of pregnancy. *Biol Reprod* **40**, 449-52.

Roberts, R.M., Cross, J.C., Leaman, D.W. (1992). Interferons as hormones of pregnancy. *Endocr Rev* **13**, 432-452.

Roche, J.F., Bolandl, M.P., Mcgeady, T.A. (1981). Reproductive wastage following artificial insemination of heifers. *Vet Rec* **109**, 401-404.

Rodríguez-Piñón, M., Meikle, A., Tasende, C., Sahlin, L., Garofalo, E.G. (2005). Differential estradiol effects on estrogen and progesterone receptors expression in the oviduct and cervix of immature ewes. *Domest Anim Endocrinol* **28**, 442-50.

Rowson, L.E., Moor, R.M. (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.

- Russel, A.J.F., Doney, J.M., Gunn, R.G. (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *Journal of Agricultural Science* **72**, 451-454.
- Scaramuzzi, R.J., Campbell, B.K., Downing, J.A., Kendall, N.R., Khalid, M., Munoz-Gutierrez, M., Somchit, A. (2006). A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev* **46**, 339-54.
- Schillo, K.K. (1992). Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *Journal of Animal Science* **70**, 1271-1282.
- Sheldrick, E.L., Flick-Smith, H.C. (1993). Effect of ovarian hormones on oxytocin receptor concentrations in explants of uterus from ovariectomized ewes. *J Reprod Fertil* **97**, 241-5.
- Short, R.V. (1969) Implantation and the maternal recognition of pregnancy. In 'Ciba Foundation Symposium on Foetal Autonomy'. Churchill Livingston, London. (Eds Wolstenholme, G.E.W. y O'Connor, M.) pp. 2-26
- Smith, W.L., Garavito, R.M., Dewitt, D.L. (1996). Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* **271**, 33157-33160.
- Sosa, C., Abecia, J.A., Palacin, I., Forcada, F., Meikle, A. (2006) El reinicio de la ciclicidad ovárica postparto en ovejas está determinado por la condición corporal al parto. In 'XXXI Jornadas Científicas y X Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC)'. Zamora, España pp. 362-365
- Spencer, T.E., Bazer, F.W. (1995). Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biology of Reproduction* **53**, 1527-1543.
- Spencer, T.E., Bazer, F.W. (1996). Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. *Endocrinology* **137**, 1144-7.
- Spencer, T.E., Ott, T.L., Bazer, F.W. (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.
- Spencer, T.E., Burghardt, R.C., Johnson, G.A., Bazer, F.W. (2004a). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci* **82-83**, 537-50.
- Spencer, T.E., Johnson, G.A., Bazer, F.W., Burghardt, R.C. (2004b). Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction* **128**, 657-68.
- Spicer, L.J., Hanrahan, J.P., Zavy, M.T., Enright, W.J. (1993). Relationship between ovulation rate and concentrations of insulin-like growth factor-1 in plasma during the oestrous cycle in various genotypes of sheep. *J Reprod Fertil* **97**, 403-9.
- Stevenson, K.R., Gilmour, R.S., Wathes, D.C. (1994). 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.

Stevenson, K.R., Wathes, D.C. (1996). Insulin-like growth factors and their binding proteins in the ovine oviduct during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* **108**, 31-40.

Sugino, T., Hasegawa, Y., Kurose, Y., Kojima, M., Kangawa, K., Terashima, Y. (2004). Effects of ghrelin on food intake and neuroendocrine function in sheep. *Anim Reprod Sci* **82-83**, 183-94.

Tasende, C., Meikle, A., Rodriguez-Pinon, M., Forsberg, M., Garofalo, E.G. (2002). Estrogen and progesterone receptor content in the pituitary gland and uterus of progesterone-primed and gonadotropin releasing hormone-treated anestrous ewes. *Theriogenology* **57**, 1719-31.

Taylor, K.M., Gray, C.A., Joyce, M.M., Stewart, M.D., Bazer, F.W., Spencer, T.E., 63:., T.B.R. (2000). Neonatal ovine uterine development involves alterations in expression of receptors for estrogen, progesterone, and prolactin. *Biology of Reproduction* **63**, 1192-1204.

Thatcher, W.W., Guzeloglu, A., Meikle, A., Kamimura, S., Bilby, T., Kowalski, A.A., Badinga, L., Pershing, R., Bartolome, J., Santos, J.E. (2003). Regulation of embryo survival in cattle. *Reprod Suppl* **61**, 253-66.

Thibodeaux, J.K., Broussard, J.R., Godke, R.A., Hansel, W. (1994). Stimulation of progesterone production in bovine luteal cells by co-incubation with bovine blastocyst-stage embryos or trophoblastic vesicles. *J Reprod Fertil* **101**, 657-62.

Thissen, J.P., Ketelslegers, J.M., Underwood, L.E. (1994). Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* **15**, 80-101.

Thomas, G.B., Mercer, J.E., Karalis, T., Rao, A., Cummins, J.T., Clarke, I.J. (1990). Effect of restricted feeding on the concentrations of growth hormone (GH), gonadotropins, and prolactin (PRL) in plasma, and on the amounts of messenger ribonucleic acid for GH, gonadotropin subunits, and PRL in the pituitary glands of adult ovariectomized ewes. *Endocrinology* **126**, 1361-1367.

Tsai, M.J., O'malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of actions of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual Review of Biochemistry* **63**, 451-486.

Ulbrich, S., Kettler, A., Einspanier, R. (2003). Expression and localization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* **84**, 279-89.

Van Lier, E., Meikle, A., Bielli, A., Akerberg, S., Forsberg, M., Sahlin, L. (2003). Sex differences in oestrogen receptor levels in adrenal glands of sheep during the breeding season. *Domest Anim Endocrinol* **25**, 373-87.

Vinoles, C., Forsberg, M., Banchero, G., Rubianes, E. (2002). Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. *Animal Science* **74**, 539-545.

Vinoles, C., Forsberg, M., Martin, G.B., Cajarville, C., Repetto, J., Meikle, A. (2005). Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction* **129**, 299-309.

- Walker, S.K., Hill, J.L., Kleemann, D.O., Nancarrow, C.D. (1996). Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. *Biol Reprod* **55**, 703-8.
- Wathes, D.C., Hamon, M. (1993). Localization of oestradiol, progesterone and oxytocin receptors in the uterus during the oestrous cycle and early pregnancy of the ewe. *Journal of Endocrinology* **138**, 479-491.
- Wathes, D.C., Lamming, G.E. (1995). The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl* **49**, 53-67.
- Wathes, D.C., Reynolds, T.S., Robinson, R.S., Stevenson, K.R. (1998). Role of the insulin-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. *J Dairy Sci* **81**, 1778-89.
- Watson, A.J., Westhusin, M.E., Winger, Q.A. (1999). IGF paracrine and autocrine interactions between conceptus and oviduct. *J Reprod Fertil Suppl* **54**, 303-15.
- Wilmut, I., Sales, D.I. (1981). Effect of an asynchronous environment on embryonic development in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility* **61**, 179-184.
- Wiltbank, M.C., Wiepz, G.J., Knickerbocker, J.J., Belfiore, C.J., Niswender, G.D. (1992). Proteins secreted from the early ovine conceptus block the action of prostaglandin F2 alpha on large luteal cells. *Biol Reprod* **46**, 475-82.
- Williams, A.H., Cumming, I.A. (1982). Inverse relationship between concentration of progesterone and nutrition in ewes. *Journal of Agricultural Science* **98**, 517-522.
- 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.
- Xiao, C.W., Liu, J.M., Sirois, J., Goff, A.K. (1998). Regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase gene expression by steroid hormones and interferon-tau in bovine endometrial cells. *Endocrinology* **139**, 2293-9.
- Xiao, C.W., Murphy, B.D., Sirois, J., Goff, A.K. (1999). Down-regulation of oxytocin-induced cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase expression by interferon-tau in bovine endometrial cells. *Biol Reprod* **60**, 656-63.
- Zhang, S., Blache, D., Blackberry, M.A., Martin, G.B. (2005). Body reserves affect the reproductive endocrine responses to an acute change in nutrition in mature male sheep. *Anim Reprod Sci* **88**, 257-69.