

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**EFFECTO DEL PLANO DE NUTRICIÓN SOBRE LA
EXPRESIÓN UTERINA DE RECEPTORES DE
PROGESTERONA EN OVINOS**

Por

Cecilia SOSA MISURACA

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

MONTEVIDEO

URUGUAY

2004



001 TG

Efecto del plan

Sosa Misuraca, Cecilia



FV26123

TUTOR de Trabajo Final:

Dra. Ana MEIKLE

CO-TUTOR de Trabajo Final:

Dr. Alejandro BIELLI

TRABAJO FINAL aprobado por:

Presidente de Mesa:

Nombre completo y firma

Segundo Miembro (Tutor):

Nombre completo y firma

Tercer Miembro:

Nombre completo y firma

Fecha:

Autor:

Nombre completo y firma

DEDICATORIA

*El camino andado ha sido intenso, maravilloso...arduo a veces, pero si he llegado hasta aquí es gracias a **mis Padres**, dos amigos de hierro, quienes me han transmitido el sentido de la responsabilidad y el esfuerzo, y quienes me han apoyado y han dado todo de sí para brindarme una buena educación y posibilidades de crecimiento...una gran muestra de amor. A ellos y al resto de mis afectos, **mi Familia y mis Amigos**, deseo agradecer por haber estado de mil maneras a lo largo de este camino que hoy culmina...*

*Extiendo mi profundo agradecimiento a **Ana Meikle**, quien ha sido una excelente guía en mis primeros pasos por el mundo de la investigación, y quien me ha transmitido su gran pasión por la ciencia.*

*Y por último, deseo dedicar este trabajo muy especialmente a **mis Nonos**, que son un ejemplo de vida y cuya confianza ciega siempre me da fuerzas ...*

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
DEDICATORIA	III
TABLA DE CONTENIDOS	IV
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1. Nutrición y Reproducción	3
3.2. Mecanismo de acción de la progesterona	6
3.3. Regulación de los receptores esteroideos	8
3.4. Útero	10
3.5. Determinación de receptores por Inmunohistoquímica	11
4. INTRODUCCIÓN	12
5. MATERIALES Y METODOS	13
5.1. Diseño experimental	13
5.2. Inmunohistoquímica	15
5.3. Análisis de imagen	16
5.4. Análisis estadístico	16
6. RESULTADOS	17
6.1. Observaciones generales	17
6.2. Porcentaje de células positivas	17
6.3. Intensidad de tinción promedio	18
7. DISCUSION	21
8. CONCLUSION	24
9. AGRADECIMIENTOS	24
10. BIBLIOGRAFÍA	25

1. RESUMEN

La subnutrición afecta la sobrevivencia embrionaria a través de cambios en el ambiente uterino. En un estudio previo se determinó que ovejas en un plano nutricional bajo (Grupo B) tienen menor contenido de progesterona en el endometrio que ovejas controles (Grupo C). En el presente estudio se investigó el efecto de la subnutrición sobre la expresión endometrial de receptores de progesterona (RP) los días 5 y 10 postestro. Se determinaron los RP por inmunohistoquímica en 8 compartimientos histológicos. La tinción en los diferentes compartimientos histológicos fue exclusivamente nuclear. El Grupo B presentó una tinción menos intensa que el Grupo C al día 5, pero no al día 10. Los receptores son capaces de retener hormonas específicas en los tejidos blanco: los niveles bajos de RP en el Grupo B concuerdan con la menor concentración de progesterona endometrial. La mayoría de los compartimientos histológicos del Grupo C tuvieron mayor intensidad de tinción el día 5 que el día 10 de acuerdo con la conocida regulación en menos de la progesterona. Sólo tres compartimientos histológicos en el Grupo B mostraron un patrón similar sugiriendo que en este grupo los niveles de RP ya eran bajos al día 5 y por lo tanto la inhibición no fue observada. Nuestros resultados indican que la expresión endometrial de RP es afectada por la subnutrición en una manera dependiente de la etapa del ciclo estral y del compartimiento histológico.

2. SUMMARY

It has been postulated that subnutrition affects embryo survival through changes in uterine environment. Ewes fed a low plane of nutrition (Group B) have a lesser P₄ endometrial content than control ewes (Group C). In this study, the effect of plane of nutrition on progesterone receptor (PR) expression in the endometrium of the ewe on days 5 and 10 of the estrous cycle was investigated. PR immunostaining of 8 cell compartments was visualized by immunohistochemistry. PR staining was detected exclusively in the nuclei of the studied cell types. Group B presented lower PR average staining than Group C on day 5 but not on day 10. Receptor proteins retain and concentrate the specific hormones in the target tissues; thus, lower contents of PR in Group B are consistent with the lower endometrial content of progesterone found in previous studies. Most cell types of Group C showed more intense staining on day 5 than on day 10 in agreement with the known progesterone downregulation of its own receptor. In group B, only three cell compartments presented downregulation, suggesting that PR contents were low already at day 5, and thus downregulation was not observed. Our results indicate that endometrial PR expression is affected in a temporal and cell type specific manner by subnutrition.

3. ANTECEDENTES

3.1. Nutrición y reproducción

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 fotoperíodo y el estrés ejercen efectos profundos sobre la actividad reproductiva (Martín, 1995).

Aunque se sabe que la nutrición tiene influencia sobre la función reproductiva en los rumiantes, la relación entre la nutrición y la reproducción es compleja (O'Callaghan y Boland, 1999). Quizás el aspecto más estudiado sea el efecto de la sobrealimentación o "flushing", como herramienta para incrementar la tasa ovulatoria. Sin embargo, es la subnutrición la que se presenta como problema en las majadas, principalmente en países subdesarrollados, en las que la alimentación es básicamente pastoril. 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 preñez 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).

Se ha demostrado que la subnutrición atrasa la pubertad tanto en ovejas como en vacas (Foster y Olster, 1985; Adam y col., 1998; Diskin y col., 2003) probablemente impidiendo el incremento prepuberal en la frecuencia de los pulsos de hormona luteinizante (LH). La subnutrición afecta la secreción de LH (Schillo, 1992; Butler, 2003), causa una disminución en la tasa de crecimiento del folículo dominante y en su diámetro máximo (Murphy y col., 1991; Mackey y col., 2000), e

induce fallas en la ovulación (Mackey y col., 2000; Boland y col., 2001). Además, se ha demostrado que ovejas subnutridas tienen menor número de folículos (≥ 3 mm) que sus controles (O'Callaghan y col., 2000b) y una menor tasa ovulatoria (Rhind y col., 1989). Una deprivación nutricional puede inducir el anestro en ganado ciclando y prolongar el anestro postparto (Schillo, 1992; Boland y col., 2001; Butler, 2003). Vacas alimentadas con dietas bajas en energía producen menos oocitos y de peor calidad que vacas con alta energía en su dieta (Butler, 2003). También en ovejas se ha observado que los oocitos 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).

La eficiencia reproductiva está asociada a la tasa de preñez. La subnutrición afecta la tasa de preñez en ovinos en los días 14 y 15 de gestación (Abecia y col., 1995; 1999) pero no en los días 8 y 9 (Abecia y col., 1997; 1999). En vacas, se observó que cuanto mayor es la pérdida de estado corporal, mayor es la reducción en la tasa de concepción (Butler, 2000). El desarrollo embrionario también es afectado por la subnutrición: Rhind y col. (1989) reportaron que la subnutrición afecta la sobrevivencia embrionaria aumentando la mortalidad de los embriones. Ovejas subnutridas tuvieron un mayor porcentaje de mórulas y blastocistos tempranos que ovejas controles, las cuales tuvieron más blastocistos expandidos luego del mismo tiempo post inseminación (Abecia y col., 1997). Sin embargo, ambos grupos presentaron similares porcentajes de embriones recuperados. En otro trabajo, se recuperó un menor porcentaje de embriones de buena calidad de ovejas subnutridas que de ovejas controles (Lozano y col., 2003). Asimismo, Parr y Williams (1982) encontraron que los embriones obtenidos de ovejas subnutridas pesaban menos que aquellos de ovejas controles. En vacas también se observó que la tasa de formación de blastocistos era menor en animales con una condición corporal baja (Butler, 2003).

La hormona de la gestación es la progesterona (P_4), la cual debe mantenerse en concentraciones elevadas para que la preñez pueda llegar a término. Una de las acciones más significativas de la P_4 es preparar al útero para la preñez: induce la secreción de las glándulas endometriales, aumenta la vascularización del estroma, bloquea las contracciones miometriales y aumenta la viscosidad del mucus cervical. Además, disminuye el número de cilias y la secreción del oviducto y promueve el desarrollo lobuloalveolar de la glándula mamaria (Niswender y Nett, 1994). En la oveja, el cuerpo lúteo (CL) es responsable de la secreción de P_4 durante los primeros 50 días de gestación, momento en que la placenta toma esa función (Niswender y Nett, 1994). Aunque se ha descrito la ausencia de efecto de la nutrición sobre la concentración plasmática de P_4 (Abecia y col., 1995), el hallazgo más contundente en la literatura es la mayor concentración plasmática de P_4 en las ovejas subnutridas cuando se las compara con ovejas controles (Williams y Cumming, 1982; Parr y col., 1987; Lozano y col., 1998; Lozano y col., 2003). Parr (1992) propuso que este fenómeno se debía a un mayor clearance hepático de la hormona, 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 de esteroide almacenado (Boland y col., 2001).

Como fue mencionado anteriormente, se demostró que la subnutrición afecta la tasa de preñez en ovinos en los días 14 y 15 de gestación, pero no en los días 8 y 9 (Abecia y col., 1995; 1997; 1999). En rumiantes, cerdos y equinos, en las primeras etapas de la gestación, ocurre la integración de una variedad de señales endócrinas y parácrinas cuyo fin es mantener la vida del CL y la secreción de progesterona. Este proceso se conoce con el término de "reconocimiento materno de la preñez". Sin duda, el momento crucial en el reconocimiento materno de la preñez en rumiantes es la liberación de interferón tau ($IFN\tau$) por parte del embrión, que reduce y altera los patrones de secreción de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) uterina evitando así el desencadenamiento de la luteólisis y asegurando la vida del

CL (Geisert y col., 1992). En vacas, las concentraciones de P_4 e $IFN\tau$ están relacionadas positivamente (Mann y col., 1998). Por lo tanto, cambios en las concentraciones plasmáticas maternas de P_4 pueden alterar la secreción de este agente antiluteolítico y ser críticas para la sobrevivencia embrionaria.

Para comprender el efecto de la subnutrición sobre el establecimiento y mantenimiento de la preñez, no sólo se debe estudiar su acción sobre los niveles plasmáticos de P_4 , sino también investigar cómo es recibida la señal hormonal por los tejidos blanco. Es decir, comprender los mecanismos moleculares que determinan respuestas diferenciales en la célula.

3.2. Mecanismo de acción de la progesterona

La P_4 y los estrógenos, debido a su naturaleza lipídica, entran a las células por difusión. Sin embargo, sólo algunos tejidos tienen la capacidad de retenerlas. Esta especificidad tisular se debe a que las hormonas se unen a receptores específicos ubicados en las células de los tejidos blanco. Estos receptores 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. Los receptores de progesterona (RP) y de estrógenos (RE), así como el resto de los receptores esteroideos, forman parte de una gran familia de factores de transcripción activados por el ligando (hormona) y comparten características estructurales. 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 ADN que interactúan con secuencias específicas del ADN (elementos de respuesta a esteroides, SRE) (Tsai y O'Malley 1994). Un modelo simplificado de la acción de las hormonas esteroideas en la célula se presenta en la Figura 1. La unión de la hormona a su receptor conlleva cambios conformacionales que convierten al complejo hormona-receptor inactivo en activo

[1, 2] (lo cual implica su dimerización [3]), y posibilita la unión a los SRE activando genes y estimulando su transcripción por ARN-polimerasas para producir ARN mensajeros (mARN) [4]. Los mARN son traducidos en los ribosomas citoplásmicos [5] para producir proteínas, que alteran la función celular, el crecimiento o diferenciación [6]. 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 (por revisión ver Clark y Mani, 1994).

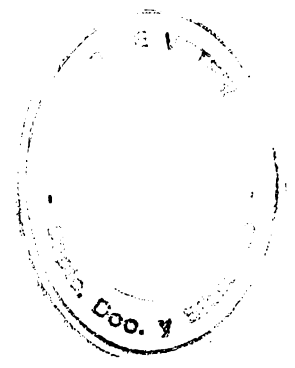
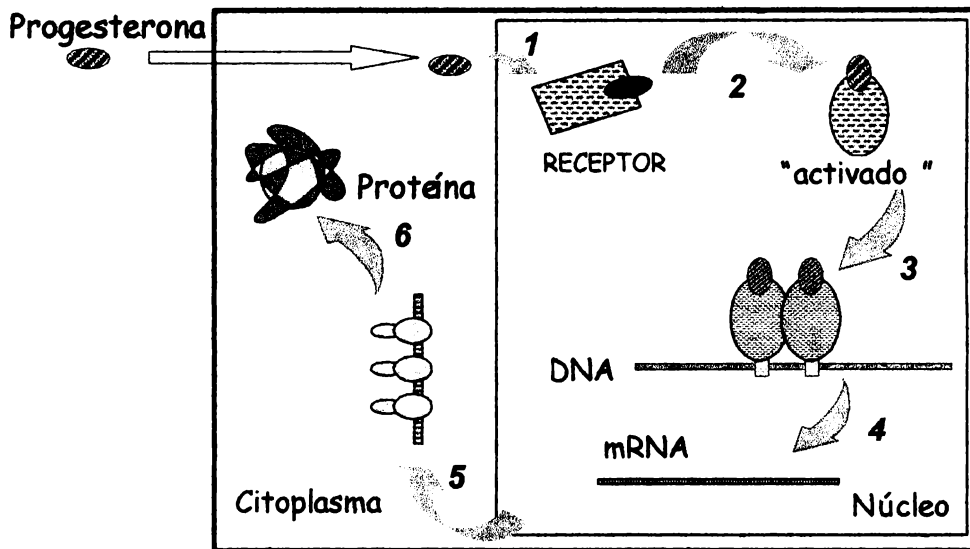


Figura I. Representación esquemática del mecanismo de acción esteroidea en las células blanco. Por explicación de la figura, ver texto. (Tomado de Meikle, 2001).

Al menos dos isoformas del RP han sido descritas en ratas: A y B (Conneely y col., 2001). Los RP-A y RP-B son expresados por diferentes promotores sobre el mismo gen y ambos se unen a la P_4 con similar afinidad e interactúan con los mismos SRE. Sin embargo, se ha sugerido en base a estudios en úteros de ratas, que el PR-A es responsable de la acción antiestrogénica de la P_4 mientras que el PR-B interviene en su efecto proliferativo (Conneely y col., 2001). Las isoformas A y B del RP también fueron demostradas en el endometrio de cerdas (Geisert y col., 1994), pero no hemos encontrado trabajos que las describan en ovinos.

La sensibilidad de un tejido a una determinada hormona está dada en parte por la concentración de receptores específicos en dicho tejido. Sin embargo, la concentración de receptores no permanece constante, ya que su expresión y su degradación están sometidas a regulación.

3.3. Regulación de los receptores esteroideos

Los receptores esteroideos actúan como intermediarios de los efectos de las hormonas esteroideas. La modulación de la concentración de estas proteínas constituye el paso más probable en el control de las respuestas celulares (Clark y Mani, 1994). La concentración uterina de los receptores esteroideos (determinados por ensayos de unión) varía a lo largo del ciclo estral de la oveja (Miller y col., 1977), el cual se caracteriza por tener una fase folicular de 2-3 días con predominio estrogénico, y una fase luteal de 12-14 días con predominio de P₄. Las hormonas esteroideas ováricas (progesterona y estrógenos) 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 RP y RE. El estradiol (E₂) estimula la síntesis de su propio receptor así como también la del RP, mientras que la P₄ provoca la regulación en menos o “downregulation” de ambos receptores (Clark y Mani, 1994). De esta manera, la concentración uterina de los RP varía a lo largo del ciclo estral, presentando valores máximos alrededor del estro como respuesta a la acción estimuladora de los estrógenos y mínimos durante la fase luteal debido a la acción inhibitoria de la P₄ (Miller y col., 1977). La relación entre RE, RP, E₂ y P₄ durante el ciclo estral del ovino se muestra en la Figura II.

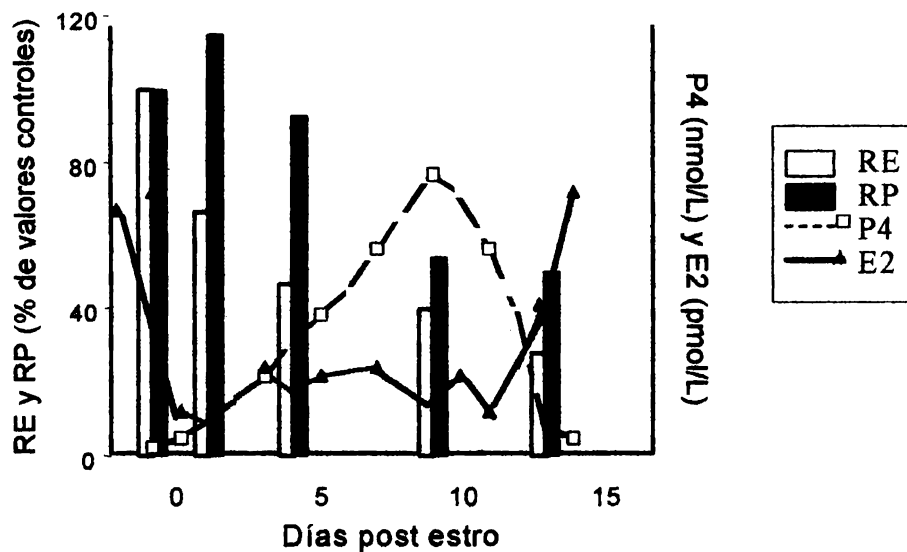


Figura II. Contenidos uterinos de RE y RP, y niveles circulantes de P₄ y E₂ durante el ciclo estral de la oveja. Los valores de RE y RP al estro fueron definidos como el 100%. (Modificado de Miller y col., 1977).

Sin embargo, ha sido descrita una regulación espacial subyacente a esta regulación de tipo temporal. En estudios inmunohistoquímicos para detectar RE uterinos en ovejas ciclando, y en ovejas ovariectomizadas tratadas con P₄ o E₂, se observó que la respuesta en términos de cantidad de receptores, fue diferente en los distintos tipos celulares. Por ejemplo, mientras que la mayoría de los tipos celulares estudiados presentó una disminución de los RE en la fase luteal tardía, esto no se observó en el estroma profundo, que mantuvo su expresión de RE a lo largo de todo el ciclo (Cherny y col., 1991). Esta diversidad de respuestas de los diferentes tipos celulares frente a un mismo estímulo también ha sido descrita por otros autores, tanto para los RE como para los RP (Wathes y Hamon, 1993; Geisert y col., 1994; Spencer y Bazer, 1995; Meikle y col., 2000).

El presente trabajo se ha centrado en el estudio de los RP específicamente en el útero dado que es el órgano donde se establece la preñez, y es por lo tanto, uno de los principales órganos blanco de la P₄. Por eso, a continuación se presenta una breve descripción de la anatomía e histología uterinas.

3.4. Útero

El útero 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 estos están unidos caudalmente por el ligamento intercornual. 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 (Hafez, 1996; Fawcett, 1988). 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 sobrevivencia 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 se da el intercambio de gases y nutrientes para el embrión (Gray y col., 2000). El endometrio sufre una serie de transformaciones cíclicas en respuesta a la fluctuación de los niveles sanguíneos de las hormonas ováricas (Hafez, 1996; Fawcett, 1988). Los estrógenos producen un notable crecimiento uterino. Durante la fase folicular, las glándulas crecen, penetran profundamente en el estroma y comienzan a arrollarse, pero su capacidad secretoria plena se da bajo la influencia de la P₄ (Niswender y Nett, 1994). Las glándulas uterinas sufren una notable hiperplasia e hipertrofia durante la preñez (Gray y col., 2001). El desarrollo y función uterinos 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 autócrinas y parácrinas dentro del tejido uterino (Cooke y col., 1998).

Debido a que la expresión de los receptores esteroideos es dependiente del tipo celular, y debido a la relevancia de la comunicación intercelular, en el presente trabajo se estudió la expresión de los RP en diferentes compartimientos histológicos del endometrio ovino. El epitelio luminal se clasificó en caruncular e intercaruncular. El epitelio glandular adyacente a la luz uterina se denominó superficial, y el adyacente al miometrio, profundo. El estroma se clasificó en estroma caruncular superficial y profundo, e intercaruncular superficial y profundo, utilizando los mismos criterios.

3.5. Determinación de receptores por Inmunohistoquímica

Existen varias técnicas para determinar las proteínas receptoras en el tejido, tales como ensayos de unión, ensayos inmunoenzimáticos, westernblot e inmunohistoquímica. Dado la importancia de la interacción celular en la función del tejido uterino, es necesario detectar qué tipos celulares contienen receptores y estimar la abundancia relativa de dichos receptores con respecto a otros tipos celulares. A diferencia de las tres primeras técnicas mencionadas, en las que el tejido es homogeneizado para su estudio, la inmunohistoquímica ofrece la posibilidad de localizar los receptores en los diferentes compartimientos histológicos, ya que se realiza sobre secciones de tejido que mantiene intacta su morfología. Esta técnica se basa en la unión altamente específica de un anticuerpo por su antígeno situado en el tejido, y en la visualización de esa reacción mediante reactivos cromógenos (Beesley, 1995). De esta manera, la localización de la reacción antígeno-anticuerpo puede ser correlacionada con la morfología del tejido, siendo esta la principal fortaleza de la inmunohistoquímica.

4. INTRODUCCION

El establecimiento de la preñez depende del sistema de comunicación entre el embrión y el ambiente uterino. La alteración de este sistema resulta en fallas en la implantación, pérdidas embrionarias tempranas y crecimiento retardado o acelerado (Barnes, 2000). El incremento de la concentración plasmática de P_4 a lo largo del ciclo estral, juega un rol preponderante en el estado de desarrollo del útero (Wilmot y Sales, 1981). Kleeman y col. (1994) encontraron que la exposición de embriones a un útero previamente estimulado con P_4 , resultaba en un incremento del crecimiento fetal. Se ha demostrado que la P_4 estimula la secreción uterina de nutrientes, factores de crecimiento y enzimas necesarias para el correcto desarrollo embrionario (Ashworth, 1995).

La P_4 tiene la habilidad de modificar la relación materno-embionaria estimulando cambios en el estado fisiológico del útero, lo suficiente para determinar la sobrevivencia embrionaria (Lawson y Cahill, 1983; Ashworth, 1995). La acción de la P_4 en el útero está mediada por interacciones con su receptor intracelular (RP) (Clark y col., 1992), por lo tanto, la respuesta celular a la hormona depende de los niveles de receptores existentes. Los mecanismos que modifican la concentración de receptores pueden ser determinantes en el control de la acción hormonal. Se ha reportado que la expresión del RP es regulada en una manera dependiente del compartimiento histológico a lo largo del ciclo estral y en la preñez temprana en ovejas (Spencer y Bazer, 1995).

Los efectos de la nutrición sobre la reproducción han sido ampliamente estudiados (por revisión ver: Rhind, 1992; O'Callaghan y Boland, 1999) y revisados anteriormente en el presente trabajo. La concentración de la P_4 plasmática periférica ha sido descrita como inversamente relacionada con el plano nutricional (Williams y Cumming, 1982; Parr y col., 1987; Lozano y col., 1998; Lozano y col., 2003). Parr (1992) atribuyó esto a un incremento en la tasa de la depuración

metabólica de la P₄ más que a cambios en la secreción de la hormona por el cuerpo lúteo.

Rhind y col. (1989) no encontraron relación entre la concentración de P₄ plasmática periférica y la sobrevivencia embrionaria y concluyeron que para dilucidar los efectos de la ingesta sobre la sobrevivencia embrionaria sería necesario determinar el aporte plasmático local de P₄ al útero. Se ha demostrado que las ovejas subnutridas presentaron mayores concentraciones plasmáticas de P₄ en la vena yugular (Lozano y col., 1998), pero las concentraciones en la vena ovárica y la arteria uterina no se vieron afectadas por el plano nutricional. Sin embargo, en ovejas subnutridas se encontró una menor concentración endometrial de P₄, sugiriendo que esto podría relacionarse con la cantidad de P₄ unida a los receptores, con lo cual el contenido endometrial de los RP sería menor en dichos animales (Lozano y col., 1998).

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto del plano nutricional sobre el contenido y la distribución de los receptores de progesterona en diferentes compartimientos histológicos endometriales en los días 5 y 10 del ciclo estral de la oveja.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Diseño experimental

El diseño experimental fue llevado a cabo en la granja experimental de la Universidad de Zaragoza, España, mientras que el estudio inmunohistoquímico y el análisis de los datos fueron realizados en la Facultad de Veterinaria, Uruguay

Se utilizaron 26 ovejas adultas de raza Rasa Aragonesa con un peso vivo promedio (\pm SEM) de 56.7 ± 1.9 kg y una condición corporal (CC) promedio (\pm

SEM) de 2.9 ± 0.1 . La CC fue determinada por palpación de las apófisis vertebrales en la región del lomo en una escala de 0 (emaciada) a 5 (obesa) (Russel y col., 1969). El estudio se realizó en ovejas ciclando para considerar solamente los efectos maternos. Las ovejas fueron sincronizadas usando esponjas intravaginales con progestágenos (Acetato de fluorogestona, Intervet S.A., Salamanca, España). Al retirar las esponjas, las ovejas fueron divididas en dos grupos en función del peso y la CC, y se les adjudicó dietas para proveer 1.5 o 0.5 veces los requerimientos diarios de mantenimiento (Grupo C –control–, $n = 13$ y Grupo B –bajo–, $n = 13$). La dieta estaba compuesta por 0.55 kg de pellet y 0.80 kg de paja de cebada (Grupo C, 12.4 MJ de energía metabolizable) o 0.10 kg de pellet y 0.50 kg de paja de cebada (Grupo B, 4.1 MJ energía metabolizable). La dieta peleteada consistía en cebada (79%), poroto de soja (15%) y suplementos minerales (6%). Estas dietas se mantuvieron a lo largo de todo el experimento.

El estro (Día 0) fue detectado diariamente utilizando carneros vasectomizados desde el día en que se retiraron las esponjas. Al día 5 ± 1 del segundo ciclo siguiendo al retiro de los progestágenos, 6 ovejas del Grupo C y 8 del Grupo B fueron eutanasiadas. Se disecaron trozos de la zona media del cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo, y se fijaron por inmersión en formol al 4% y fueron luego mantenidos en etanol a 4°C hasta ser incluidos en bloques de parafina por técnicas histológicas de rutina. Este procedimiento fue repetido en las ovejas restantes al día 10 ± 1 (Grupo C, $n = 7$ y Grupo B, $n = 5$).

Durante el experimento, el Grupo B presentó una disminución progresiva en el peso vivo y la CC, mientras que no hubo cambios detectables en el Grupo C (Lozano y col., 1998). Los parámetros endócrinos fueron publicados previamente (Lozano y col., 1998): el grupo B presentó una mayor concentración periférica de P_4 que el grupo C desde el día 5 al 10. La concentración de P_4 en el endometrio ipsilateral (pg/mg) fue mayor en el grupo C que en el grupo B al día 5 (27.4 ± 2.1 vs. $16.2 \pm$

2.6, $P < 0.05$), pero no se observó el mismo efecto de la nutrición al día 10 (Grupo C, 18.1 ± 2.0 vs. Grupo B, 20.6 ± 3.0).

5.2. Inmunohistoquímica

Para visualizar los RP se utilizó la técnica de inmunohistoquímica (avidina-biotina-peroxidasa) previamente descrita por Meikle y col. (2000). Después que los cortes de tejido ($5 \mu\text{m}$) fueron desparafinados y rehidratados, se realizó un procedimiento de recuperación antigénica. Las secciones fueron pretratadas en microondas a 900 watts de potencia, en citrato de Na 0.01 M (pH 6.0) por 10 min, y se dejó enfriar durante 20 minutos. Después de un lavado en buffer (PBS 0.01 M, pH 7.5) la actividad inespecífica de las peroxidases endógenas fue bloqueada con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% (Merck) en metanol por 10 min a temperatura ambiente. Luego de un lavado de 10 min en buffer, los preparados fueron incubados por 60 min en una cámara húmeda a temperatura ambiente, con suero de caballo diluido en PBS (Vectastain; Vector Laboratories, Burlingame, CA). El anticuerpo primario anti RP fue diluido 1:100 en PBS (anticuerpo monoclonal de ratón; Zymed Cat No. 18-0172, South San Francisco, CA; USA) e incubado por 1 hora. Los controles negativos se obtuvieron reemplazando el anticuerpo primario por un suero inespecífico de ratón a una concentración equivalente (Cat No. sc-2025, Santa Cruz, California, USA). Luego de la unión al anticuerpo primario, los tejidos fueron incubados por 60 min con una IgG biotinilada anti- IgG de ratón producida en caballos (Vectastain, Vector) diluida 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 fue visualizado por medio de 3,3'-diaminobencidina en H_2O_2 (DAB kit; Vector), un cromógeno que produce un precipitado marrón insoluble cuando se incuba junto con la enzima. Las secciones de tejido fueron contracoloradas con hematoxilina y deshidratadas antes de ser montadas con cemento sintético Pertex (Histolab, Gothenburg,



Suecia). La inmunohistoquímica fue realizada en el mismo ensayo para todos los preparados histológicos.

5.3. Análisis de imagen

Se llevó a cabo un análisis de imagen subjetivo para estimar la expresión de los RP en el endometrio. La evaluación fue realizada por dos observadores independientes que desconocían la conformación de los grupos. La expresión de RP fue estudiada en 8 compartimientos histológicos. El epitelio luminal fue clasificado en dos regiones: caruncular e intercaruncular. El epitelio glandular fue dividido según su ubicación en: superficial y profundo. El estroma se clasificó en estroma caruncular superficial y profundo, y estroma intercaruncular superficial y profundo. Se analizaron 10 campos por compartimiento histológico por animal (total de observaciones por observador: 2080) a un aumento de X1000. La intensidad de tinción se clasificó en negativa (-), leve (+), moderada (++) o intensa (+++) y cada categoría se expresó en % de la cantidad total de células (Thatcher y col., 2003).

5.4. Análisis estadístico

Las variables consideradas fueron el porcentaje de células positivas y la intensidad de tinción promedio de los 10 campos. El porcentaje de células positivas por campo se calculó como = número estimado de células positivas / total de células x 100. La intensidad de tinción promedio se calculó como = $1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3$, donde n = proporción de células por campo que exhiben tinción leve (1), moderada (2) e intensa (3) (Boos y col., 1996). Para el análisis estadístico se utilizó el Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA 1989). Los datos se analizaron por procedimiento mixto y el modelo incluyó los efectos del observador, tratamiento (bajo vs. control), día del ciclo (5 vs. 10), compartimiento histológico (epitelio luminal vs. epitelio glandular vs. estroma), región (caruncular vs. intercaruncular) y ubicación (superficial vs. profundo) y las

interacciones entre ellos. Los datos se presentan como promedios mínimos cuadrados \pm errores estándares. El nivel de significación fue $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. Observaciones generales

La tinción de los RP fue observada exclusivamente en el núcleo (y no en el citoplasma) de las células epiteliales y estromales de todos los compartimientos endometriales estudiados en ambos grupos (Figura IIIB). La inmunorreacción positiva fue también observada en las células del miometrio. Las células de los endotelios vasculares no presentaron una tinción específica. Cuando el anticuerpo monoclonal primario fue sustituido por un anticuerpo inespecífico, la ausencia de tinción demostró la alta especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo (Figura IIIA).

6.2. Porcentaje de células positivas

Hubo efectos significativos de la región, el compartimiento histológico y la ubicación ($P < 0.0001$) sobre el porcentaje de células positivas. Los epitelios (luminal y glandular) presentaron un mayor porcentaje de células positivas que el estroma (al día 5: 84 % vs. 53%, respectivamente). El Grupo B tuvo menor cantidad de células positivas que el Grupo C, excepto al día 10 en el estroma intercaruncular (Cuadro 1). En los epitelios, ambos grupos presentaron mayor porcentaje de células positivas al día 5 que al día 10, excepto en el epitelio glandular profundo del Grupo B. Las células del estroma presentaron un patrón diferente: en el Grupo B hubo más células teñidas al día 10 que al día 5 excepto en el estroma intercaruncular profundo, y no se observó efecto del día en el Grupo

C, excepto en el estroma intercaruncular profundo, donde hubo mayor porcentaje de células positivas al día 5 que al día 10 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentaje de células positivas en el tejido endometrial a los días 5 y 10 del ciclo estral (Estro=Día 0), en ovejas del Grupo C y Grupo B. Los valores se presentan como porcentaje del total de células \pm errores estándar.

Compartimiento histológico	Grupo B		Grupo C		
	Día 5	Día 10	Día 5	Día 10	
Epitelio	ELI	80.5 \pm 1.6 ^a	65.7 \pm 2.0 ^b	89.0 \pm 1.8 ^c	76.4 \pm 1.7 ^d
	ELC	82.0 \pm 2.0 ^a	59.0 \pm 2.6 ^b	92.6 \pm 2.1 ^c	76.6 \pm 2.0 ^d
	EGS	87.3 \pm 1.6 ^a	68.0 \pm 2.0 ^b	94.7 \pm 1.8 ^c	74.0 \pm 1.7 ^d
	EGP	66.6 \pm 1.6 ^a	64.3 \pm 2.0 ^a	77.1 \pm 1.9 ^b	71.3 \pm 1.7 ^c
Estroma	EIS	44.5 \pm 1.6 ^a	64.1 \pm 2.0 ^b	63.3 \pm 1.8 ^b	65.3 \pm 1.7 ^b
	EIP	31.6 \pm 1.6 ^a	33.8 \pm 2.0 ^a	44.2 \pm 1.9 ^b	30.6 \pm 1.7 ^a
	ECS	47.2 \pm 2.0 ^a	58.7 \pm 2.6 ^b	66.4 \pm 2.0 ^c	64.4 \pm 2.0 ^c
	ECP	48.4 \pm 2.0 ^a	57.8 \pm 2.6 ^b	68.4 \pm 2.0 ^c	64.9 \pm 2.0 ^c

ELI = epitelio luminal intercaruncular; ELC = epitelio luminal caruncular; EGS = epitelio glandular superficial; EGP = epitelio glandular profundo; EIS = estroma intercaruncular superficial; EIP = estroma intercaruncular profundo; ECS = estroma caruncular superficial; ECP = estroma caruncular profundo. Valores con diferentes letras dentro de la misma fila son significativamente diferentes, $P < 0.05$.

6.3. Intensidad de tinción promedio

Hubo un efecto significativo del observador, día, compartimiento histológico y ubicación sobre la intensidad de tinción promedio ($P < 0.0001$) y una interacción entre día y tratamiento ($P = 0.09$). Los datos de ambos observadores fueron agrupados para estudiar las diferencias entre tratamientos y días. Los datos de intensidad de tinción promedio en los diferentes compartimientos histológicos se muestran en la Figura IV. En general, el Grupo B presentó una tinción menos intensa (menor cantidad de RP) que el Grupo C al día 5 del ciclo, pero esto no se observó al día 10. En el Grupo C, 6 de 8 compartimientos histológicos tuvieron

mayor intensidad de tinción al día 5 que al día 10. En el Grupo B, este patrón sólo se observó en el epitelio luminal (caruncular e intercaruncular) y las glándulas superficiales (Figura IV).

Al día 5, ambos grupos presentaron mayor intensidad de tinción en el epitelio glandular superficial que en el profundo, pero esta diferencia no se encontró al día 10 ($P < 0.001$). El estroma intercaruncular superficial mostró una tinción más intensa que el profundo, y el estroma caruncular profundo tuvo mayor intensidad de tinción que el estroma intercaruncular profundo (Figura IV).

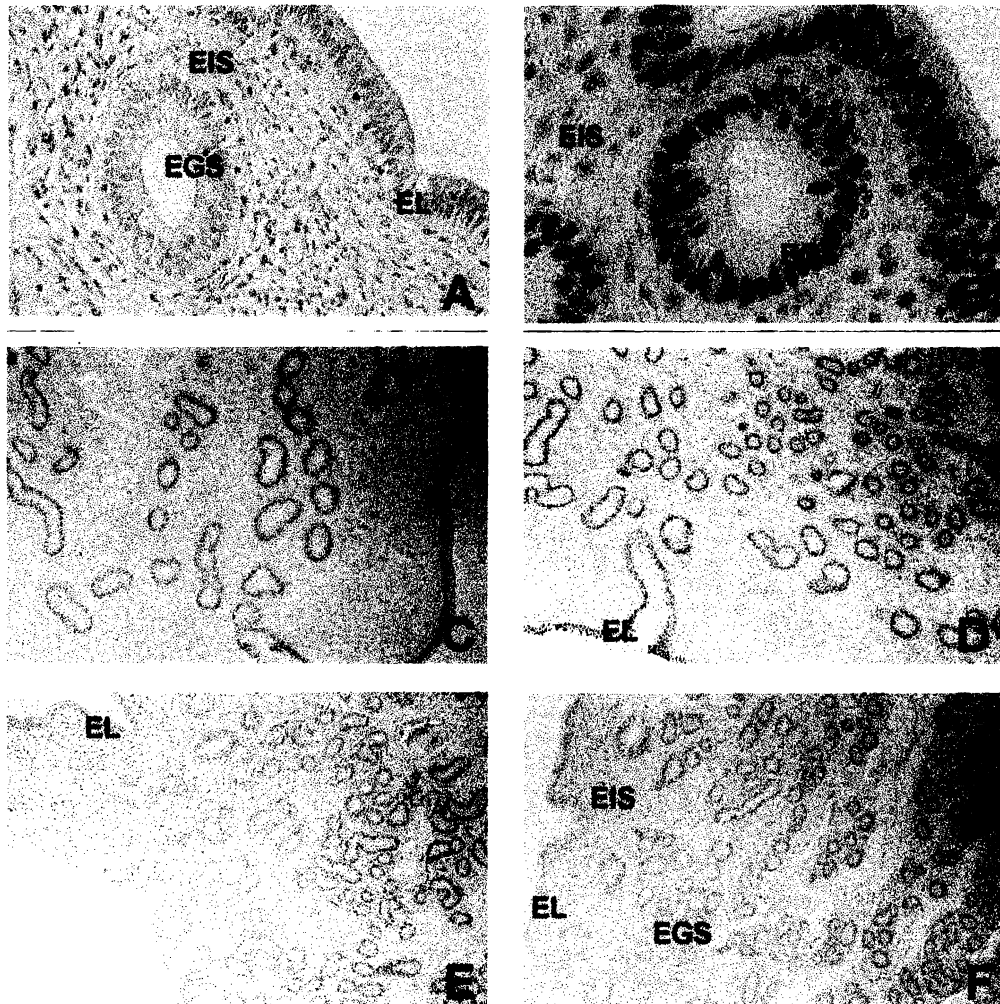
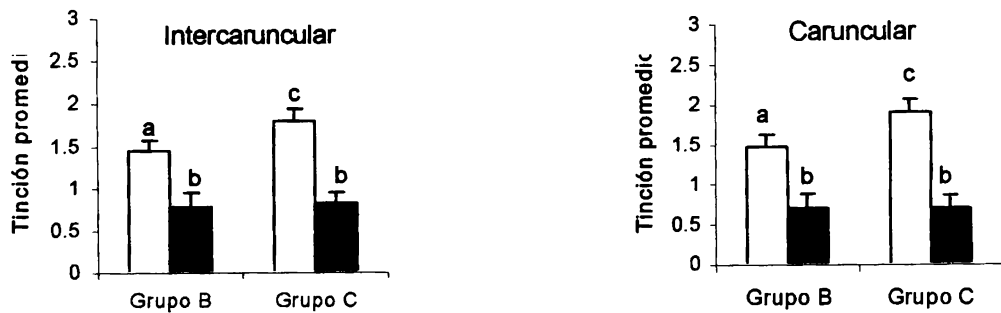
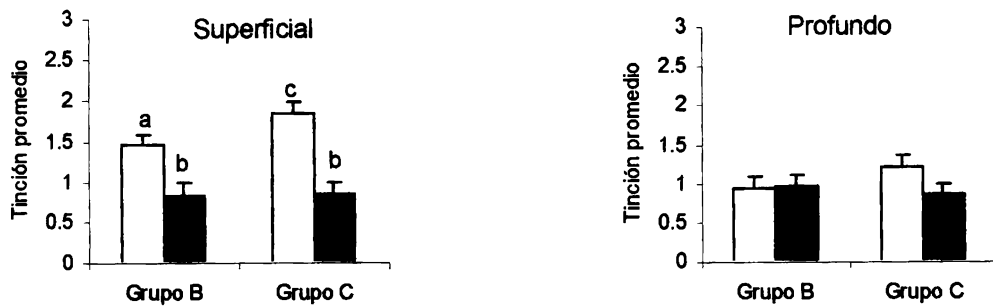


Fig III. Localización inmunohistoquímica de los RP en el endometrio de ovejas alimentadas con diferentes planos nutricionales. (EGS = epitelio glandular superficial, EIS = estroma intercaruncular superficial, EL = epitelio luminal). (A) Control negativo (400X); (B) Tinción nuclear exclusiva (600X); (C) Grupo B, Día 5 (100X); (D) Grupo C, Día 5 (100X); (E) Grupo B, Día 10 (100X); (F) Grupo C, Día 10 (100X).

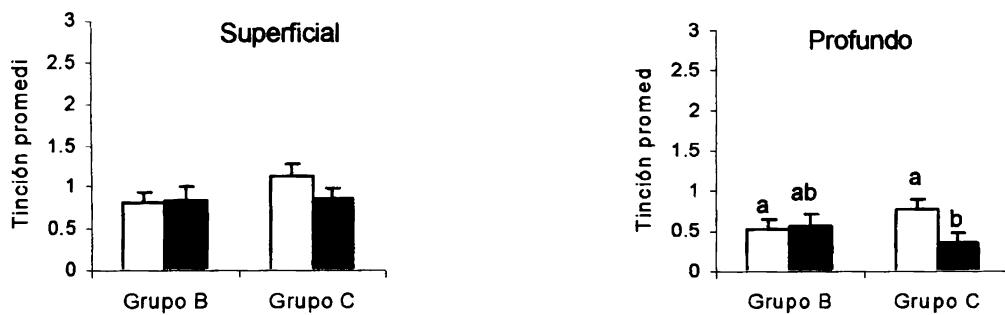
Epitelio luminal



Epitelio glandular



Estroma intercaruncular



Estroma caruncular



Figura IV. Intensidad de tinción promedio de los RP los días 5 (□) y 10 (■) del ciclo estral de ovejas alimentadas con un plano de nutrición bajo (Grupo B) y control (Grupo C). Barras (promedios mínimos cuadrados \pm errores estándares) con diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

7. DISCUSION

Este estudio demostró que la subnutrición afecta el contenido endometrial de los RP en la fase luteal temprana del ciclo estral de la oveja. Al día 5, las ovejas alimentadas con un plano nutricional bajo presentaron una menor intensidad de tinción promedio de RP (menor contenido de RP) que las ovejas alimentadas con una dieta que cubría sus necesidades diarias de mantenimiento. Es conocido que las proteínas receptoras retienen y concentran las hormonas específicas en los tejidos blanco (Clark y col., 1992), por lo tanto, el menor contenido de RP en el Grupo B podría explicar los hallazgos de Lozano y col. (1998), donde las ovejas subnutridas presentaron un menor contenido endometrial de P_4 que las controles al día 5, aún presentando mayores concentraciones plasmáticas de P_4 . No se observaron diferencias en la tinción de RP al día 10, y esto concuerda con los similares contenidos endometriales de P_4 encontrados en ambos grupos en este día (Lozano y col., 1998).

Como la P_4 ejerce una regulación en menos sobre su propio receptor (Clark y Mani, 1994), la mayor concentración de P_4 durante el ciclo estral en las ovejas subnutridas (Lozano y col., 1998) podría explicar parcialmente la menor cantidad de RP encontrada al día 5 en este grupo. Sin embargo, no se observaron diferencias entre grupos en la concentración de P_4 hasta el día 5 -día en que se tomaron las muestras- y estos valores eran bajos (aprox. 0,7 ng/mL, Lozano y col., 1998). Otra alternativa para explicar el menor contenido de RP en el endometrio de ovejas subnutridas observado en el presente estudio, puede ser a través de posibles diferencias en el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) cuya concentración plasmática disminuye en las ovejas subnutridas (Hua y col., 1995): 1) Como el IGF-I estimula el crecimiento y la diferenciación de las células ováricas (Lucy y col., 1999), la menor concentración de IGF-I provocada por una privación nutricional podría llevar a una menor producción de E_2 , y en consecuencia, a una menor cantidad de RP. 2) Se ha sugerido que el IGF-I

estimula la función del RE de una manera independiente del ligando (Flint y col., 2002), y RE a su vez, es el principal inductor de la expresión de RP, por lo tanto, un nivel nutricional bajo podría resultar en un menor contenido de los RP endometriales.

La mayoría de los compartimientos histológicos del Grupo C presentaron una tinción promedio para RP más intensa al día 5 que al día 10, lo cual concuerda con la conocida regulación en menos de la P_4 sobre su propio receptor descrita en varias especies (Clark y col., 1992). Las concentraciones uterinas de RE y RP son mayores alrededor del estro en respuesta a los estrógenos y menores en la fase luteal debido a la acción inhibitoria de la P_4 (Miller y col., 1977). En el Grupo B, sólo tres de ocho compartimientos presentaron mayor contenido de RP al día 5 que al día 10 y no hay una explicación obvia para este hecho. Se podría especular que en el Grupo B, el endometrio era muy poco sensible a la P_4 ya al día 5 (menor expresión de RP) y por lo tanto, la inhibición no pudo ser observada.

Las células epiteliales presentaron una mayor intensidad de tinción de los RP que las células del estroma y la regulación en menos de los RP también fue más pronunciada en las primeras. Meikle y col. (2000) describieron el mismo fenómeno para la regulación de los $RE\alpha$ por los estrógenos en el endometrio ovino, sugiriendo que el estroma responde menos intensamente que el epitelio. Asimismo, las células del estroma mantuvieron la tinción de RP a lo largo de todo el ciclo estral en otras especies (Brenner y col., 1990: primates; Geisert y col., 1994: suinos).

La intensidad de tinción también se vio afectada por la ubicación celular. Mientras que se observó una regulación en menos de los RP en el epitelio glandular superficial, esto no se observó en el epitelio glandular profundo en ninguno de los grupos. Hallazgos similares han sido descritos en primates: el epitelio glandular profundo mantuvo su tinción de RP durante más tiempo que las zonas más superficiales (Brenner y col., 1990). El epitelio glandular superficial tuvo una tinción

de RP más intensa que el epitelio glandular profundo en ambos grupos al día 5. En trabajos previos también se ha reportado que la ubicación celular afecta el contenido de los receptores esteroideos sexuales en el endometrio de los rumiantes (Cherny y col., 1991, Meikle y col., 2000, Thatcher y col., 2003), pero la razón para esta diferencia en la expresión de los receptores a lo largo de las glándulas endometriales aún no se conoce. En el estroma intercaruncular también se observaron diferencias en la ubicación celular: el estroma superficial presentó una tinción más intensa que el estroma profundo, independientemente del grupo y del día del ciclo. Esta potencial mayor sensibilidad a las hormonas esteroideas sexuales del estroma superficial puede ser relacionada con un rol funcional, ya que éste es el compartimiento histológico más íntimamente ligado al epitelio luminal. En el útero, los RE estromales son esenciales para la mitogénesis y secreción del epitelio inducidas por el E₂ y actuarían a través de factores parácrinos (Cooke y col., 1998).

El hallazgo más interesante de este trabajo fue el menor contenido endometrial de RP en las ovejas subnutridas al día 5 del ciclo. Tomando en cuenta que la P₄ puede modificar la relación embrio-maternal (Lawson y Cahill, 1983), la menor sensibilidad del endometrio a la P₄ en las ovejas subnutridas podría afectar la sobrevivencia embrionaria. En trabajos previos, la subnutrición afectó el desarrollo embrionario: las ovejas subnutridas (alimentadas con las mismas dietas que en el presente trabajo) tuvieron mayor porcentaje de mórulas y blastocistos tempranos, mientras que ovejas bien alimentadas tuvieron mayor número de blastocistos expandidos al mismo tiempo post-servicio (Abecia y col., 1997).



8. CONCLUSION

Los resultados del presente trabajo indican que en la oveja, la subnutrición provoca una reducción en la sensibilidad del endometrio a la acción de la progesterona en la fase luteal temprana -demostrado por el menor contenido de RP en las ovejas subnutridas al día 5 -, y que este efecto varía de acuerdo al compartimiento histológico.

9. AGRADECIMIENTOS

A los Dres. A. Abecia y F. Forcada del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España, por proveer los bloques de parafina para la realización de este trabajo.

A mis tutores, la Dra. A. Meikle y el Dr. A. Bielli, por su gran apoyo y dedicación para llevar este trabajo adelante.

A la Dra. Carolina Viñoles por haber sido uno de los observadores que realizó la evaluación subjetiva de la expresión de RP.

A la Dra. Celia Tasende por haber leído y criticado constructivamente este trabajo.

10. BIBLIOGRAFIA

- Abecia JA, Rhind SM, Bramley TA, McMillen SR (1995). Steroid production and LH receptor concentrations of ovarian follicles and corpora lutea and associated rates of ova wastage in ewes given high and low levels of food intake before and after mating. *Anim Sci*; 61:57-62.
- Abecia JA, Lozano JM, Forcada F, Zaragaza L (1997). Effect of the level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day eight of pregnancy in Rasa Aragonesa ewes. *Anim Rep Sci*; 48: 209-218.
- Abecia JA, Lozano JM, Forcada F (1999). A preliminary study on the effects of dietary energy and melatonin on the *ex vivo* production of progesterone and prostaglandin F_{2α} by the corpora lutea and endometrial tissue of ewes. *Vet Res Com*; 23(2): 115-121.
- Adam CL, Findlay PA, Kyle CE, Young P (1998). Effect of restricted nutrition on timing of puberty in female Soay Sheep. *J Reprod Fertil*; 112(1): 31-37.
- Ashworth, CJ (1995). Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. *Livestock Production Science*; 44:99-105.
- Azzarini, M (2002). Potencial reproductivo de los ovinos. X Congreso Latinoamericano de Buiatría, Paysandú, Uruguay, 123-130.
- Barnes, FL (2000). The effects if the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Theriogenology*; 53: 649-658.
- Beesley, JE (1995). Immunocytochemical avenues. En: Immunocytochemistry: a practical approach. Gran Bretaña. Eds. Rickwood D. y Hames BD. pp 7-13.
- Boland MP, 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. *Anim Reprod Sci*; 44:11-21.
- Brenner RM, West NB, McCellan MC (1990). Estrogen and progestin receptors in the reproductive tract of male and female primates. *Biol Reprod*; 42:11-19.
- Butler, WR (2000). Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci*; 60-61: 449-457.
- Butler, WR (2003). Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science*; 83: 211-218.
- Cherny RA, Salamonsen LA, Findlay JK. (1991). Immunocytochemical localization of oestrogen receptors in the endometrium of the ewe. *Reprod Fert Dev*; 3: 321-331.
- Clark JH, Schrader WT, O'Malley BW (1992). Mechanisms of steroid hormones action. En: Wilson JD and Foster DW (Eds), *Textbook of Endocrinology*, WB Saunders, Philadelphia, pp 35-90.
- Clark J H, Mani S K. (1994). Actions of ovarian steroid hormones. En: 'The Physiology of Reproduction'. (Eds E. Knobil and J. D. Neill.) pp. 1011-46. (Raven Press: New York.)
- Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lyndon JP, De Mayo F. (2001). Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. *Mol Cell Endocrinol*; 179: 97-103.
- Cooke PS, Buchanan DL, Lubahn DB, Cunha GR (1998). Mechanism of estrogen action: lessons from the estrogen receptor- α knockout mouse. *Biol Reprod*; 59: 470-475.
- Cunha GR, Young P, Brody JR (1989). Role of uterine epithelium in the development of myometrial smooth muscle cells. *Biol Reprod*; 40(4): 861-871.
- Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenan JM (2003). Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci*; 78: 345-370.

- Fawcett D.W (1988). Sistema reproductor femenino. En: Fawcett D.W. Tratado de histología. 12ª edición. Madrid, Interamericana-McGraw Hill. pp 909-912.
- Flint APF, Sheldrick EL, Fisher PA (2002). Ligand-independent activation of steroid receptors. *Dom Anim Endoc*; 23:13-24.
- Foster DL, Olster DH (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(1): 375-381.
- Geisert RD, Short EC, Zavy MT (1992). Maternal recognition of pregnancy. *Anim Reprod Sci*; 28: 287-298.
- Geisert RD, Pratt TN, Bazer FW, Mayes JS, Watson GH. (1994) Immunocytochemical localization and changes in endometrial progesterin receptor protein during the porcine oestrous cycle and early pregnancy. *Reprod Fertil Dev*; 6(6):749-60.
- Gray CA, Bartol FF, Taylor KM, Wiley AA, Ramsey WS, Ott TL, Bazer FW, Spencer TH (2000). Ovine uterine gland knock-out model: effects of gland ablation on the estrous cycle. *Biol Reprod*; 62: 448-456.
- Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TH (2001). Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod*; 65:1311-1323.
- Hafez, ES (1996). Anatomía del aparato reproductor femenino. En: Reproducción e inseminación artificial en animales. 6ª edición. Madrid, Interamericana-McGraw Hill. pp 20-52.
- Hua KM, Hodgkinson SCS, Bass JJ (1995). Differential regulation of plasma levels of insulin-like growth factors-I and -II by nutrition, age and growth hormone treatment in sheep. *J Endocrinol*; 147(3):507-516.
- Kleeman DO, Walker SK, Seamark RF (1994). Enhanced fetal growth in sheep administered progesterone during the first three days of pregnancy. *J Reprod Fertil*; 102: 411-417.

- Lawson RAS, Cahill LP (1983). Modification of the embryo-maternal relationship in ewes by progesterone treatment early in the oestrous cycle. *J Reprod Fertil*; 67: 473-475.
- Lindsay D, Martin G, Williams I (1993). Nutrition and reproduction. En: *Reproduction in Domesticated Animals: World Animal Sciences Series*. Ed. GJ King. Elsevier Science Publishers, Amsterdam., pp 459-491.
- Lozano JM, Abecia JA, 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 JM, Lonergan P, Boland MP, O'Callaghan D (2003). Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction*; 125:543-553.
- Lucy MC, Bilby CR, Kirby CJ, Yuan W, Boyd CK (1999). Role of growth hormone in development and maintenance of follicles and corpora lutea. *J Reprod Fertil Suppl*; 54:49-59.
- Mackey DR, Wylie AR, Sreenan JM, Roche JF, Diskin MG (2000). The effect of acute nutritional change on follicle wave turnover, gonadotropin, and steroid concentration in beef heifers. *J Anim Sci*; 78(2): 429-442.
- Mann GE, Lamming GE, Fisher PA (1998). Progesterone control of embryonic interferon tau production during early pregnancy in the cow. *J Reprod Fertil Abstract Series 21 Abstract 37*.
- Martin GB (1995). Reproductive research on farm animals for Australia –some long-distance goals. *Reprod Fertil Dev*; 7(5): 967-982.
- Meikle A, Bielli A, Masironi B, Pedrana G, Wang H, Forsberg M, Shalin L (2000). An immunohistochemical study on the regulation of estrogen receptor α by the estradiol in the endometrium of the immature ewe. *Reprod Nutr Dev*; 40: 587-596.
- Meikle, A. (2001). PhD thesis. Reproductive endocrinology of prepubertal and anestrus ewes. Regulation of uterine sex steroid receptors by ovarian

hormones and effects of estradiol on gonadotropin secretion and follicular growth. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Uppsala, ISSN 1401-6257, ISBN 91-576-5915-X.*

Miller BG, Murphy L, Stone GM (1977). Hormone receptor levels and hormone, RNA and protein metabolism in the genital tract during the oestrous cycle of the ewe. *J. Endocrinol; 73: 91-98.*

Murphy MG, Enright WJ, Crowe MA, McConnell K, Spicer LJ, Boland MP, Roche JF (1991). Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. *J Reprod Fertil; 92: 333-338.*

Niswender GD, Nett T.M. (1994). Corpus luteum and its control in infraprimate species. En: 'The Physiology of Reproduction'. Eds E. Knobil and J. D. Neill, pp. 781-816. (Raven Press: New York.)

O'Callaghan D, Boland MP (1999). Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Anim Sci; 68:299-314.*

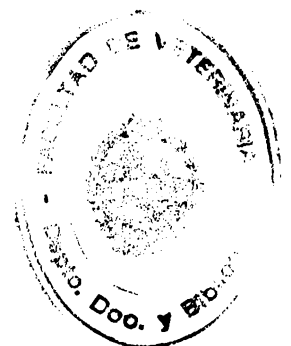
O'Callaghan D, Lozano JM, Fahey J, Gath V, Snidjers S, Boland MP (2000a). Recent developments in the effect of nutrition on fertility in dairy cows. *Irish Veterinary Journal; 53: 417-426.*

O'Callaghan D, Yaakub H, Hyttel P, Spicer LJ, Boland MP (2000b). Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J Reprod Fertil; 118: 303-313.*

Parr RA, Williams AH (1982). Nutrition of the ewe and embryo growth during early pregnancy. *Aust J Biol Sci; 35(3): 271-276.*

Parr RA, Davis IF, Fairclough RJ, Miles MA (1987). Overfeeding during early pregnancy reduces peripheral progesterone concentration and pregnancy rate in sheep. *J Reprod Fertil; 80: 317-320.*

Parr, RA (1992). Nutrition-progesterone interactions during early pregnancy in sheep. *Fertil Dev; 4(3):297-300.*



- Rhind SM, McMillen S, Wetherill GZ, McKelvey WAC, Gunn RG (1989). Effects of low levels of food intake before and/or after mating on gonadotrophin and progesterone profiles in Greyface ewes. *Anim Prod*; 49: 267-273.
- Rhind, SM (1992). Nutrition: its effect on reproductive performance and its control in female sheep and goats. En: Progress in sheep and goat research, AW Speedy ed. pp 25-52. CAB International, Wallingford.
- Russel AJF, Doney JM, Gunn RG (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *J. Agric. Sci., Cambridge*; 72: 451-454.
- Schillo, KK (1992). Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J Anim Sci*; 70: 1271-1282.
- Spencer TE, Bazer FW (1995). Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol Reprod*; 53:1527-1543.
- Taylor KM, Gray CA, Joyce MM, Stewart MD, Bazer FW, Spencer TE (2000). Neonatal ovine uterine development involves alterations in expression of receptors for estrogen, progesterone, and prolactin. *Biol Reprod*; 63:1192-1204.
- Thatcher WW, Guzeloglu A, Meikle A, Kamimura S, Bilby T, Kowalski AA, Badinga L, Pershing R, Bartolome J, Santos JEP (2003). Regulation of embryo survival in cattle. *Reproduction Supplement 61*, 253-266.
- Tsai MJ, O'Malley BW (1994). Molecular mechanisms of actions of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem*; 63: 451-86.
- Wathes DC, Hamon M. (1993). Localization of oestradiol, progesterone and oxytocin receptors in the uterus during the oestrous cycle and early pregnancy of the ewe. *J Endocrinol*; 138: 479-491.
- Williams AH, Cumming IA (1982). Inverse relationship between concentration of progesterone and nutrition in ewes. *J Agric Sci, Cambridge*; 98: 517-522.
- Wilmot I, Sales DI (1981). Effect of an asynchronous environment on embryonic development in sheep. *J Reprod Fertil*; 61: 179-184.