



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

***INFLUENCIA DEL AMBIENTE UTERINO DURANTE LA
GESTACIÓN TEMPRANA EN EL CRECIMIENTO
EMBRIONARIO, EN MADRES SUFFOLK Y CHEVIOT***

LIC. MILENA SEQUEIRA RODRÍGUEZ

TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

**URUGUAY
2015**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

***INFLUENCIA DEL AMBIENTE UTERINO DURANTE LA
GESTACIÓN TEMPRANA EN EL CRECIMIENTO
EMBRIONARIO, EN MADRES SUFFOLK Y CHEVIOT***

LIC. MILENA SEQUEIRA RODRIGUEZ

PhD. Ana Meikle
Directora de Tesis

PhD. Sarah Pain
Co-Director de Tesis

2015

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

ACTA DE DEFENSA DE TESIS

INFORME DEL TRIBUNAL

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	5
SUMMARY	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Fertilidad y transferencia embrionaria ovina	7
1.2. Desarrollo embrionario temprano y ambiente uterino.....	7
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	11
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	13
3.1 Hipótesis.....	13
3.2. Objetivo General.....	13
3.3. Objetivos Específicos.....	13
4. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN.....	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
5.1. Experimento 1	15
5.1.1. Determinaciones hormonales	15
5.2. Experimento 2	16
5.2.1. Determinación de transcritos	16
5.2.2. Localización proteica y análisis de imagen	18
5.3. Análisis Estadístico.....	19
6. RESULTADOS	20
6.1. Experimento 1	20
6.1.1. Perfiles endócrinos.....	20
6.2. Experimento 2	22
6.2.1. Expresión génica.....	22
6.2.1. Expresión proteica	25
7. DISCUSIÓN	27
8. CONCLUSIONES	32
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

RESUMEN

La hipótesis de esta tesis fue que existen diferencias endocrinas entre ovejas de genotipo grande (Suffolk) y pequeño (Cheviot) que están asociadas a diferencias en el crecimiento embrionario temprano; y que la expresión génica y proteica endometrial al día 19 de gestación depende de la raza de la oveja pero también de la raza del embrión transferido. En el experimento 1 se determinaron las concentraciones circulantes de progesterona (P_4), factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1), insulina y adiponectina (Adipoq) en ovejas Suffolk y Cheviot durante la gestación temprana. Las ovejas Cheviot presentaron mayor concentración de P_4 que las ovejas Suffolk desde el día 6 al 21 de preñez, además la P_4 se vió afectada por la tasa de ovulación, las ovejas con dos cuerpos lúteos tuvieron mayores concentraciones de P_4 que las ovejas con ovulación única. Las concentraciones de insulina también fueron mayores en ovejas Cheviot, mientras que las concentraciones de IGF-1 no difirieron entre razas. Las ovejas Suffolk presentaron mayores concentraciones de Adipoq. En el experimento 2 se determinó la expresión génica y/o proteica de receptores de progesterona (*PR*), estrógenos alfa (*ER α*), de insulina (*INSR*), de Adipoq 1 y 2 (*AdipoR1/R2*) y de IGF tipo 1 (*IGFR1*), *IGF-1*, *IGF-2*, proteínas de unión a IGF (*IGFBPs*) 1 a 6, mucina 1 (*MUC-1*), ciclooxigenasa 2 (*PTGS2*) y antígeno nuclear de proliferación celular (*PCNA*). La expresión génica de *PR*, *IGF-1*, *IGFBP2* e *IGFBP5* fue mayor en ovejas Suffolk que en las Cheviot. La expresión de *IGF-2* e *IGFBP3* fue mayor en ovejas Cheviot con embriones Cheviot que ovejas Cheviot con embriones Suffolk. Las ovejas con embriones Cheviot tendieron a presentar mayor expresión de ARNm de *PTGS2* que ovejas con embriones Suffolk. La expresión de *IGFR1* tendió a ser mayor en ovejas Suffolk con embriones Cheviot que en ovejas Suffolk con embriones Suffolk. La intensidad de tinción de *ER α* fue mayor en ovejas Cheviot que en las Suffolk, mientras que las ovejas Suffolk tendieron a presentar mayor intensidad de tinción para *PTGS2*. Las ovejas Cheviot con embriones Suffolk tuvieron una menor tinción de *PTGS2* que las ovejas Suffolk con embriones Suffolk. Este estudio mostró que las diferencias endócrinas durante la gestación temprana podrían estar explicando las diferencias en el crecimiento embrionario al día 19 de gestación entre razas. La expresión endometrial de las proteínas relacionadas a la gestación en ovejas Suffolk y Cheviot se vió afectada por la raza de las ovejas así como también por la del embrión, mostrando que la comunicación útero-concepto es influida por las razas desde muy temprano en la gestación.

SUMMARY

The hypothesis of this thesis was that there are endocrine differences between big (Suffolk) and small genotype (Cheviot) ewes that are associated with differences in early embryonic growth; endometrial gene and protein expression at day 19 of gestation depends on the breed of the ewes but also of the breed of the embryo transferred. In Experiment 1 circulating concentrations of progesterone (P_4), insulin like growth factor 1 (IGF-1), insulin and adiponectin (Adipoq) were determined in Suffolk and Cheviot ewes during early gestation. Cheviot ewes showed higher P_4 concentration than Suffolk ewes from day 6 to 21 of pregnancy, in addition P_4 was affected by ovulation rate, the ewes with two corpora lutea had higher P_4 concentrations than the ewes with just one ovulation. Insulin concentrations were also higher in Cheviot ewes, while IGF-1 did not differ among breeds. Suffolk ewes had higher concentrations of Adipoq. In experiment 2 gene and / or protein expression of receptors of progesterone (PR), estrogen alpha ($ER\alpha$), insulin (INSR), Adipoq 1 and 2 (AdipoR1 / R2) and IGF type 1 (IGFR1), IGF-1, IGF-2, IGF binding proteins (IGFBPs) 1 to 6, mucin-1 (MUC-1), cyclooxygenase-2 (PTGS2) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were determined. Gene expression of *PR*, *IGF-1*, *IGFBP2* and *IGFBP5* was higher in Suffolk than in Cheviot ewes. The expression of *IGFBP3* and *IGF-2* was higher in Cheviot ewes embryo Cheviot ewes embryo Suffolk. Ewes carrying Cheviot embryos tended to have higher PTGS2 mRNA expression than ewes carrying Suffolk embryo. IGFR1 expression tended to be higher in Suffolk ewes carrying Cheviot embryo than in Suffolk ewes carrying Suffolk embryo. The staining intensity of $ER\alpha$ was higher in Cheviot than in Suffolk ewes, while Suffolk ewes tended to have higher staining intensity for PTGS2. Cheviot ewes carrying embryo Suffolk had lower staining for PTGS2 than the Suffolk ewes carrying Suffolk embryos. This study showed that the endocrine differences during early gestation could be explaining the differences in embryonic growth at day 19 of gestation between breeds. The endometrial expression of proteins related to pregnancy in Suffolk and Cheviot ewes were affected by the breed of ewe as well as for the embryo breed, showing that utero-conceptus communication is influenced by the breeds from very early in gestation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Fertilidad y transferencia embrionaria ovina

La fertilidad puede verse afectada por numerosos factores como el estrés, la nutrición, la estación del año, el intervalo parto-servicio, las condiciones climáticas, la presencia y comportamiento de los machos, la edad de la oveja y el grado de consanguinidad del rebaño (Buratovich, 2010).

El desarrollo embrionario preliminar y la preparación del útero para la implantación son los mayores determinantes en la fertilidad (Wen-ge et al., 2003), ya que las pérdidas embrionarias ocurren con mayor frecuencia durante la pre-implantación, por disfunciones uterinas o problemas en el desarrollo del concepto (Al-Gubory et al., 2014). Se ha propuesto que una importante causal de las pérdidas embrionarias postransferencia es la "aptitud" de las receptoras para promover el crecimiento embrionario y mantener la preñez (Cowley et al., 1989).

El desarrollo folicular, el desarrollo embrionario temprano y la implantación son procesos complejos regulados por múltiples mecanismos celulares, hormonales y moleculares que permiten que luego de la fertilización el embrión pueda continuar su desarrollo, superar la fase de reconocimiento materno de la gestación, adherirse e implantarse en útero y así aumentar sus posibilidades de sobrevivencia (Peña et al., 2007). Se ha demostrado que el ambiente uterino es clave en el desarrollo del feto e incluso del recién nacido, en varias especies (Dickinson et al., 1962; Walton y Hammond, 1938; Cowley et al., 1989; Allen et al., 2002a; Allen et al., 2002b; Giussani et al., 2002; Allen et al., 2004; Gardner et al., 2007; Gootwine et al., 2007).

1.2. Desarrollo embrionario temprano y ambiente uterino

La implantación embrionaria es un proceso complejo que comprende varias etapas, comenzando por la fijación del blastocisto al útero y terminando con la formación de la placenta definitiva. El diálogo existente entre madre – embrión desde el inicio de la gestación, es mediado por señales moleculares y celulares, que finalmente llevan a una sincronía entre el desarrollo del embrión y una serie de eventos inducidos en el útero por acción de los estrógenos (E) y la progesterona (P₄; Harvey et al., 1995; Wen-ge et al., 2002). El crecimiento y desarrollo del concepto (embrión y membranas extra embrionarias asociadas) en la pre-implantación, son primariamente regulados por el histotrofo, secretado principalmente por el epitelio luminal y glandular (Satterfield et al., 2006). Para el establecimiento y mantenimiento de la preñez la P₄ juega un papel crucial (Clement et al., 2009), preparando el endometrio, aumentando el número y la secreción de las glándulas endometriales e inhibiendo la motilidad del miometrio. Actúa sobre el endometrio induciendo la expresión de genes que codifican para proteínas que son secretadas al ambiente uterino (Satterfield et al., 2006). La P₄ actúa estimulando y mediando cambios para el crecimiento y diferenciación del concepto durante la preñez temprana (Lonergan y Forde, 2015). La acción

de la P₄ es mediada principalmente por su receptor (PR; Clark et al., 1992). La exposición continua del útero a la P₄ provoca una regulación negativa de los mismos en el epitelio luminal y glandular. Por esta razón los PR no son detectables en estos tipos celulares, en ovejas, luego del día 11-13 de gestación (Spencer y Bazer, 1995).

Desde la fertilización y hasta su ingreso al útero el embrión se encuentra libre en la luz oviductal. Durante este tiempo sufre una serie de divisiones mitóticas, denominadas clivaje, que dividen el gran volumen citoplasmático del cigoto en varias células más pequeñas, los blastómeros, para formar una masa de células totipotenciales, llamada mórula, estado en el que ingresa al útero.

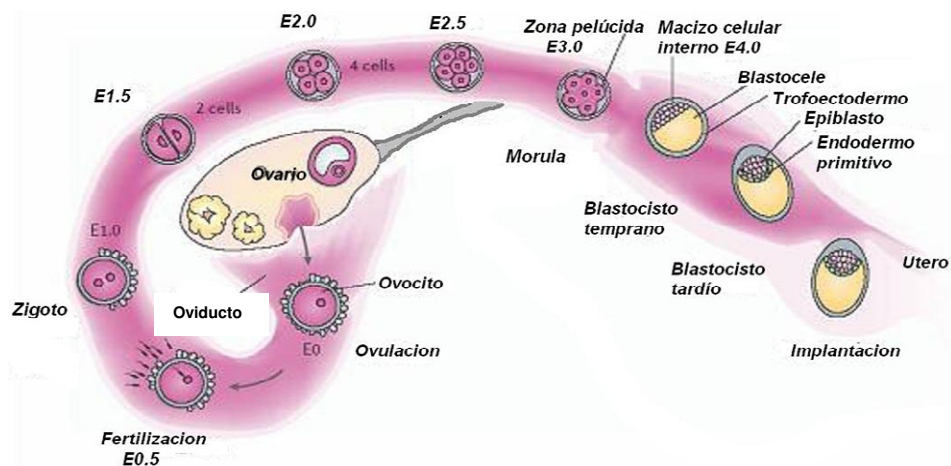


Figura 1. Desarrollo pre-implantatorio e implantación de un embrión ovino. Modificado de Fontana, (2008).

En ovinos, aproximadamente al día 4 de preñez, el embrión ingresa al útero (mórula, 16 – 32 células) (Figuras 1 y 2), y dos días después se forma el blastocisto. Este es una masa esférica de células que presenta una cavidad central llena de líquido (blastocelo) y está rodeada por dos capas celulares: la externa (trofoblasto) dará lugar a los anexos embrionarios y la interna (embrioblasto) al embrión.

Entre los días 8-9, el blastocisto tiene forma esférica, mide 200 µm de diámetro y tiene aproximadamente 300 células, es entonces que comienza la pérdida de la zona pelúcida, y como consecuencia, comienza a observarse la aparición de los primeros contactos entre el trofoectodermo y el epitelio luminal. También en esta instancia el blastocisto se posiciona e inmoviliza, la orientación del blastocisto no se da al azar, sino que es característico dentro de cada especie (Spencer et al., 2004b). Al día 10 el blastocisto ya mide entre 400 y 900 µm de diámetro y tiene unas 3000 células y comienza a elongarse, en primera instancia se desarrolla en forma tubular y continúa hasta desarrollarse en un conceptoo filamentoso (Wintenberger-Torres y Flechon, 1974), dependiente de las secreciones uterinas (Kim et al., 2011).

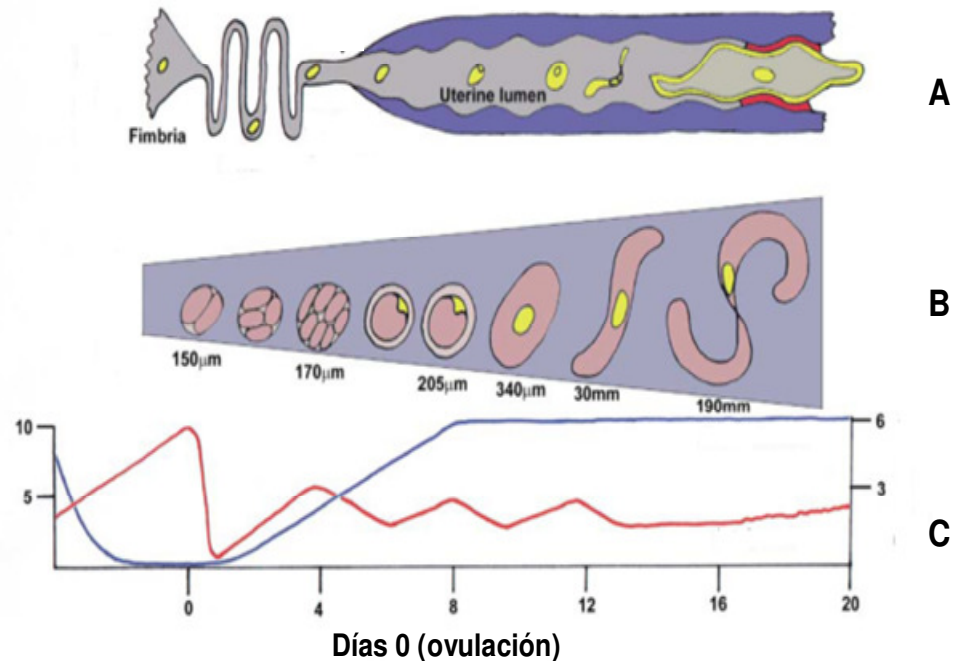


Figura 2. Migración (A) y desarrollo (B) del embrión en el tracto reproductivo ovino y perfiles de estrógenos y progesterona (C, líneas roja y azul, respectivamente) durante la preñez temprana (día 0= ovulación). Modificado de Spencer y Bazer, (1995).

Tanto el endometrio como el embrión secretan a la interfaz materno-fetal una cantidad indefinida de factores de crecimiento, hormonas, proteínas y otras sustancias que afectan la sincronía madre-embrión (Martal et al., 1997). Godkin et al. (1982) aislaron la proteína responsable de bloquear el mecanismo luteolítico, proteína trofoblástica ovina (oPN), que más tarde se denominó interferón tau ($IFN\tau$) (Roberts et al., 1992). Esta etapa de elongación es crucial para que comience la secreción de $IFN\tau$ (Farin et al., 1989; Guillomot et al., 1993) el que asegura el mantenimiento del CL y por consiguiente el mantenimiento de la preñez, mediante la inhibición de la expresión de los receptores de estrógeno α ($ER\alpha$, Kim et al., 2003). Los estrógenos vía sus receptores estimulan la expresión de los PR (Clark y Mani, 1994) que en conjunto con la P_4 son muy importantes en el mantenimiento de la preñez. Se ha observado que una alta concentración circulante de P_4 en el período inmediato a la post-concepción se asocia, en ovinos, con el progreso en la elongación del concepto (Satterfield et al., 2006). Esto a su vez, se asocia con una mayor producción de $IFN\tau$, principalmente debido al aumento de tamaño del trofoblasto (Goff, 2002). El tamaño del embrión es importante para evitar la luteólisis, embriones pequeños no serían capaces de producir suficiente $IFN\tau$ para impedir la luteólisis y mantener la preñez (Abecia et al., 2001; Lonergan y Forde, 2015). Se acepta que la elongación del concepto y secreción de $IFN\tau$ se relacionan con la expresión de ciclooxigenasa 2 (PTSG2) en el epitelio luminal y por lo tanto la producción de prostanglandinas (PGs) (Hamilton y Kennedy, 1994; Kim et al., 2003). Es decir, la gestación inhibe la secreción pulsátil de PGs, responsable de la luteólisis, pero aumenta su secreción *in situ*.

Hacia el día 14-15, el blastocisto ya está ocupando el largo total del cuerno uterino ipsilateral al CL y sus membranas se extienden por el cuerno contralateral, es en esta etapa que fortalece el contacto con el EL, dando comienzo al período de aposición (Guillomot et al., 1993; Brook et al., 2014). Este proceso está acompañado de una reducción de las microvellosidades que rodean al trofoectodermo (Guillomot et al., 1981, 1993).

Hacia el día 22 tiene lugar el período de adhesión del trofoblasto al epitelio luminal (Boshier, 1969; Guillomot et al., 1981), durante este proceso el endometrio sufre importantes modificaciones, así como la reducción en la expresión de la proteína anti-adhesiva mucina 1 (MUC1; Figura 3) que se relaciona directamente con la pérdida en la expresión de RP en el epitelio luminal (Spencer et al., 2004). La expresión de MUC1 limita la accesibilidad del trofoblasto (Carson et al., 2000; Burghardt et al., 2002); por lo tanto la reducción en su expresión permite el inicio del proceso de implantación-adhesión en ovejas (Johnson et al., 2001). Aunque su función durante este proceso no ha sido por completo aclarada, el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), que es una proteína central responsable en la decisión de vida o muerte celular, actuando en conjunto con p53 puede provocar proliferación celular, reparación del ADN o apoptosis (Paunesku et al., 2001), procesos que están íntimamente ligados a la implantación embrionaria (Parr et al., 1987). En roedores, la expresión endometrial de PCNA correspondiente a embriones que no alcanzaron la madurez y no se implantaron exitosamente fue elevada (Martin et al., 2011), los autores sugirieron que un aumento excesivo en la tasa de proliferación puede ser el resultado del desacoplamiento entre la función endometrial y el desarrollo embrionario.

El factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) tiene función en el desarrollo del embrión previo a la implantación, en el desarrollo fetal y participa del control del desarrollo placentario (Wathes et al., 1998). Este factor es secretado principalmente en el hígado de forma endócrina y de forma parácrina en el útero. Es uno de los principales factores responsables en el incremento del desarrollo embrionario y endometrial (Wathes et al., 1998; Watson et al., 1999) y actúa principalmente a través de receptores específicos tipo I (IGF-IR) de alta afinidad. Cann et al. (1997) sugirieron un rol específico de IGF-1 en el útero durante la preñez temprana, pero no durante el período de adhesión del embrión a la pared uterina. Más aún, medios conteniendo trofoblasto reducen la secreción de IGF-1 en las células decidualizadas (Hess et al., 2007), por lo que puede postularse una regulación negativa de la presencia del embrión sobre la secreción de IGF-1, quien actuó previamente estimulando el crecimiento y desarrollo del mismo. La disponibilidad de este factor es regulada por las proteínas de unión a IGF (IGFBPs; Brahmkhatri et al., 2015). Se ha propuesto que también la insulina posee un rol estimulador de la función uterina (Ayalon, 1978).

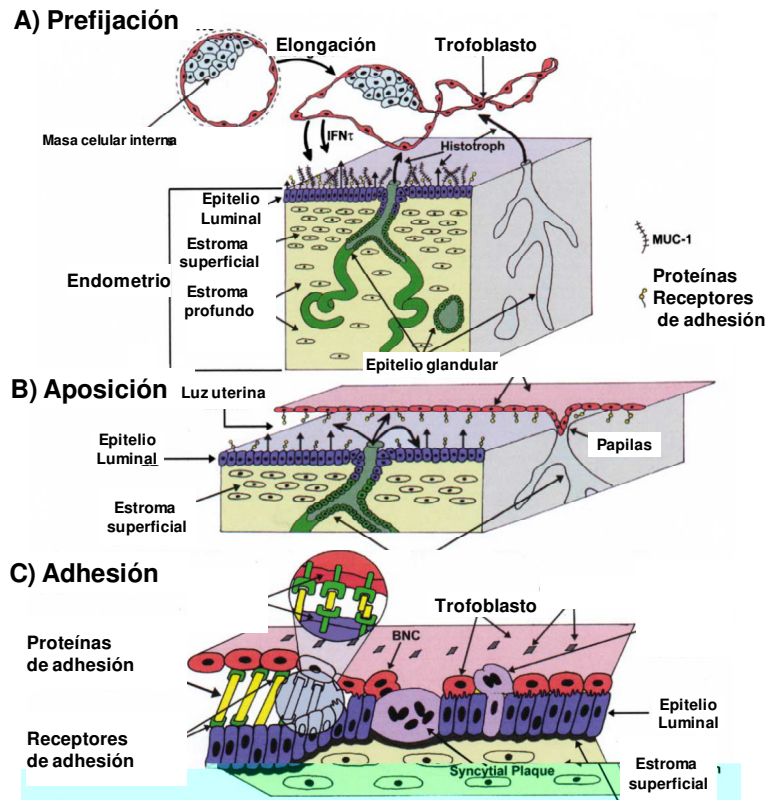


Figura 3. Procesos secuenciales de la interacción del trofoblasto al endometrio pre-fijación (A), aposición (B) y adhesión (C). Adaptado de Spencer et al., 2004.

Otra hormona metabólica que regula la función reproductiva es la Adiponectina (Adipoq) secretada por el tejido adiposo (Smidka y Maresová, 2015). En ratas Adipoq y sus receptores AdipoR1 y AdipoR2 se expresan en las células de la teca, en el cuerpo lúteo y en el oocito (Chabrolle et al., 2007). Incluso, en conejos, se ha visto que Adipoq, AdipoR1 y AdipoR2 se expresan en las glándulas endometriales en el período pre-implantatorio (Takemura et al., 2006). En humanos la expresión de ambos receptores AdipoR1 y R2, se ve incrementada durante la fase luteal media, que es el período en que el endometrio es receptivo al embrión (Kao et al., 2002; Riesewijk et al., 2003; Mirkin et al., 2005). Al presente no hemos encontrado ningún reporte científico que haya detectado receptores de Adipoq en útero de rumiantes.

Se sabe de la implicancia de estas proteínas en el proceso de adhesión e implantación embrionaria, momento crítico para la supervivencia y desarrollo del mismo, pero aún se desconoce el rol que cumplen en dichos procesos.

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Como se mencionó anteriormente, desde el inicio y hasta el final de la gestación es necesario que exista un diálogo materno-fetal. Esto asegura una adecuada demanda de nutrientes por parte del embrión/feto y, por lo tanto, un correcto aporte de los mismos por parte de la madre. Esto se hace evidente cuando al transferir embriones a ovejas receptoras que no están en

la misma etapa gestacional que las donadoras (Wilmot y Sales, 1981), o al cuerno uterino contra-lateral al CL, los embriones sufren retardo en su desarrollo e incluso mueren (Moor y Rowson, 1966).

El papel del tamaño materno como regulador del peso al nacimiento fue investigado por primera vez en el trabajo de Walton y Hammond (1938), en el que cruzaron caballos Shire (tamaño grande) con Shetland ponis (tamaño pequeño), y viceversa, y reportaron que el ambiente uterino restrictivo de las madres pequeñas resultó en un menor peso de los potrancos Shire al nacimiento, mientras que el ambiente amplio aumentó el tamaño al nacimiento de los potrancos Shetland. Los efectos del ambiente uterino materno sobre el peso al nacer y el crecimiento post-natal fueron reportados subsecuentemente en diferentes especies (Dickinson et al., 1962; Cowley et al., 1989; Allen et al., 2002b; Giussani et al., 2002; Wilsher y Allen, 2002; Allen et al., 2004; Gardner et al., 2007; Gootwine et al., 2007).

En 2007, en un experimento de cruzamiento de razas usando ovejas pequeñas (Cheviot) y grandes (Suffolk), Jenkinson et al (2007), reportaron que los corderos nacidos de madres Cheviot fueron más pequeños comparados con los de la misma raza nacidos de madres Suffolk. Se podría postular que tanto el ambiente endocrino sistémico (concentraciones de progesterona, insulina e IGF-I y adiponectina) y/o el ambiente uterino local (expresión proteica) de las madres Suffolk (genotipo grande) son beneficiosos para estimular un mejor desarrollo embrionario y fetal, pero no hemos encontrado antecedentes al respecto. Por otro lado, un experimento de transferencia recíproca no se había hecho aún en ovinos, necesario para comprender plenamente el efecto del ambiente uterino sobre el desarrollo embrionario.

Sharma et al, (2013) realizando transferencia de embriones en diferentes razas demostró que el ambiente uterino es capaz de regular el crecimiento embrionario desde muy temprano en la gestación (día 19), incluso cuando la capacidad uterina no es un factor limitante. Este autor hizo transferencia de embriones Suffolk a madres Suffolk (genotipo grande, ambiente uterino amplio) y Cheviot en Cheviot (genotipo pequeño, ambiente uterino restrictivo), y viceversa (Suffolk en Cheviot y Cheviot en Suffolk), y encontró que los embriones Suffolk eran más pequeños cuando se desarrollaban en madres Cheviot (ambiente restrictivo), comparado con la transferencia de embriones Suffolk desarrollados en madres Suffolk. Por el contrario, embriones Cheviot transferidos a madres Suffolk (ambiente amplio) presentaron una longitud mayor al compararlos con los que se desarrollaron en madres Cheviot. Incluso, estos embriones (Cheviot en Suffolk, CinS) eran aún mayores que los embriones Suffolk en Suffolk (SinS).

Los mecanismos biológicos que pueden explicar las diferencias moleculares observadas no se habían explorado hasta el momento de desarrollar esta tesis.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Se ha propuesto que una importante causal de las pérdidas embrionarias postransferencias es la “aptitud” de las receptoras para promover el crecimiento embrionario y mantener la preñez (Cox et al., 1998).

Estudios recientes donde se realizaron transferencias de embriones de genotipo grande o pequeño a madres grandes o pequeñas (Sharma, 2013), demostraron que el ambiente uterino es capaz de regular el crecimiento embrionario desde muy temprano en la gestación (día 19), incluso cuando la capacidad uterina no es un factor limitante. Los embriones de genotipo pequeño (Cheviot) transferidos a madres Suffolk (genotipo grande) fueron mayores al día 19 que los Cheviot en madres Cheviot, e incluso mayores que los Suffolk en madres Suffolk, y lo opuesto sucedió con embriones Suffolk en madres Cheviot.

En base a ello, esta tesis tiene como finalidad comprender el ambiente endocrino de dos genotipos ovinos muy diferentes en tamaño (Suffolk y Cheviot) durante la gestación temprana y evaluar la funcionalidad uterina (expresión génica proteica y líquido uterino) en hembras Suffolk y Cheviot transferidas con embriones Suffolk y Cheviot. La comprensión del diálogo materno-embriónal permitirá mejorar la eficiencia reproductiva en general, y la transferencia embrionaria en particular.

3.1 Hipótesis

Existen diferencias endócrinas entre ovejas de genotipo grande (Suffolk) y pequeño (Cheviot) que están asociadas a diferencias en el crecimiento embrionario temprano. La expresión génica y proteica endometrial al día 19 de gestación depende de la raza de la oveja pero también de la raza del embrión transferido (Cheviot vs Suffolk).

3.2. Objetivo General

Contribuir con el conocimiento de los procesos biológicos y las interacciones que se dan entre la madre y el embrión durante la preñez temprana en ovinos.

3.3. Objetivos Específicos

- 3.3.1. Determinar si existen diferencias en las concentraciones circulantes de P_4 , IGF-1, Insulina y Adipoq, en ovejas Suffolk y Cheviot (genotipos grande y pequeño, respectivamente) durante la gestación temprana.
- 3.3.2. Determinar y cuantificar la expresión de ARNm de *PR*, *ER α* , *INSR*, *IGF-1*, *IGF-2*, *IGFR1*, *IGFBPs 1 a 6*, *AdipoR1/R2*, *MUC-1* y *PTGS2*, en el endometrio de

ovejas Suffolk y Cheviot con embriones Suffolk y Cheviot transferidos a ambas razas.

3.3.3. Estudiar la localización inmunohistoquímica de PR, ER α , IGF-1, IGFR1, PTGS2 y PCNA al día 19 de gestación.

4. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Para cumplir con el objetivo 1 se seleccionaron madres de raza de genotipo grande y de genotipo pequeño (Suffolk y Cheviot, respectivamente) a las que se realizó inseminación artificial (IA) y se caracterizó el perfil endócrino durante la gestación temprana. Se realizaron muestreos de sangre frecuentes y se determinaron las concentraciones sanguíneas de hormonas que pueden influir en el ambiente uterino y desarrollo embrionario. Para cumplir con los objetivos 2 y 3 se realizó una matriz de 2x2 para aislar el efecto del ambiente materno (uterino) sobre el embrión, transfiriendo embriones puros (Suffolk y Cheviot) a madres receptoras Suffolk y Cheviot, formando cuatro grupos de estudio, dos controles: grande (SinS, embrión Suffolk en madre Suffolk) y pequeño (CinC, embrión Cheviot en madre Cheviot); ambiente amplio (CinS, embrión Cheviot en madre Suffolk) y ambiente restringido (SinC, embrión Suffolk en madre Cheviot). Se determinó la expresión de genes y proteínas vinculados a las hormonas del experimento 1 y relacionados a la familia de IGFs.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo implica una cooperación entre la Universidad de Massey, Nueva Zelanda y la Facultad de Veterinaria - Universidad de la República, Uruguay. Ambos experimentos fueron realizados en Nueva Zelanda y las muestras enviadas al Laboratorio de Técnicas Nucleares (Facultad de Veterinaria-UdelaR) para su estudio.

Para ambos experimentos, de acuerdo con protocolos anteriormente establecidos para la modificación del ambiente uterino (Jenkinson et al., 2007; Sharma et al., 2013), se utilizaron ovejas de las razas Cheviot y Suffolk, que proporcionan diferentes genotipos, determinando un tamaño corporal diferente en la edad adulta, con una diferencia de ~15kg (peso vivo promedio pre apareamiento (\pm SEM), 57,9 \pm 7,3 kg y 74,3 \pm 9,2 kg, respectivamente).

Los animales fueron mantenidos bajo condiciones comerciales en la granja Keeble de la Universidad de Massey, Palmerston North, Nueva Zelanda. Los procedimientos con los animales fueron aprobados por el comité de ética de Nueva Zelanda.

5.1. Experimento 1

Se sincronizó el estro de 160 ovejas, 80 Cheviot y 80 Suffolk, de entre 3 y 6 años, usando un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (Eazi-breed CIDR; Pharmacia; Auckland, New Zealand) durante 13 días, y una dosis única de PGF2 α enseguida de la remoción del CIDR. El semen se colectó por electroeyaculación de 4 carneros por raza, con el cual se realizó un pull y se inseminó a las ovejas de la misma raza (día 0) por laparoscopia con 0,5 mL de semen fresco, 32 horas luego de la remoción del CIDR.

Desde el día 0 (IA) al 21, día por medio, a 12 ovejas de cada raza se les extrajo muestras de sangre de la yugular con tubos vacutainers. Se aisló el suero por centrifugación de las muestras a 3000 rpm durante 15 min, se alicuotaron en tubos limpios rotulados y se las conservó a -20°C para las determinaciones hormonales.

Al día 21 de gestación, una sub-muestra de ovejas, que presentaron doble ovulación fueron sacrificadas, el útero y ovarios fueron removidos y de inmediato puestos en hielo para ser pesados y medidos. Cada cuerno fue lavado con 20 mL (0,9%) de solución salina estéril para recuperación de embriones; los que fueron identificados bajo microscopio óptico y cuando fue necesario separados de sus membranas extraembrionarias, se los preservó en viales de 5 mL conteniendo solución salina tamponada al 10%. Solamente las ovejas que tuvieron embriones viables se utilizaron para el análisis estadístico (Cheviot, n= 8 y Suffolk, n= 7).

5.1.1. Determinaciones hormonales

Se determinaron las concentraciones hormonales de ovejas Suffolk y Cheviot desde el día 0 (IA) al 21 de preñez.

Las concentraciones de P₄ se determinaron utilizando un kit comercial de RIA (Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, USA). El límite de detección del ensayo fue de 0,06 ng/mL y el CV intra-ensayo para el Control 1 (0,47 ng/mL) y Control 2 (7,81 ng/mL) fue 17% y 3,9%, respectivamente.

La insulina fue determinada por inmunoradiometría con un kit usado previamente para ovinos (IRMA; INS-IRMA; Diasource, Brussels, Belgium; de Brun et al., 2014). El límite de detección fue de 2,8 μ UI/mL y el CV intra-ensayo para el Control 1 (22,5 μ UI/mL) y Control 2 (91,0 μ UI/mL) fue 9,3% y 4,5%, respectivamente.

Las concentraciones de IGF-1 se determinaron en dos ensayos, por un procedimiento previamente descrito por de Brun et al. (2015). El límite de detección fue de 0,55 ng/mL y el CV intra e inter-ensayo para el Control 1 (36,8 ng/mL) fueron 7,9% y 9,4% y para el Control 2 (520,2 ng/mL) fueron 7,4% y 11%, respectivamente.

Las concentraciones de Adipoq se determinaron por un kit comercial de radioinmunoanálisis (RIA; HADP-61 HK, Linco, Millipore) de acuerdo a

Raddatz et al. (2008). La sensibilidad del ensayo fue 1,1 ng/mL. El CV del intra-ensayo para el Control 1 (11,9 ng/mL) y el Control 2 (60,5 ng/mL) fueron 9,3% y 7,0%, respectivamente.

5.2. Experimento 2

Para este experimento se utilizaron 22 donadoras (9 Suffolk y 13 Cheviot) de 4 años y 110 receptoras (58 Suffolk y 52 Cheviot) de entre 3 y 6 años, a las cuales se les sincronizó el estro con dispositivos de liberación de progesterona (Eazi-breed CIDR; Pharmacia; Auckland, Nueva Zelanda) durante 13 días y luego se realizó superovulación vía inyección de 216 mgNIH de FSH porcino (Folltropin-V; BionicheAnimal Health; Ontario, Canadá), administrada en siete dosis que fueron en disminución (48, 48, 28, 28, 24, 20, 20 mgNIH/ dosis) en intervalos de 12 horas, comenzando 60 horas antes de la remoción del CIDR, momento en el cual se les inyectó 200UI de gonadotropina (Pregnenol; Horizon Technology Pty Ltd; NSW, Australia); 32 horas más tarde las donadoras fueron inseminadas con 0,5 mL del “pull” de semen de 4 carneros de su propia raza, el cual se recogió por electro eyaculación.

Al día 6, los embriones fueron recuperados por laparoscopia de línea media, para lo que cada cuerno uterino fue lavado con 50 mL de solución comercial para recuperación de embriones (Complete Ultra, Emcare Flush; ICP Bio Limited; Henderson, Auckland, Nueva Zelanda), fueron colectados en una placa de Petri e inmediatamente evaluados con microscopio de luz (aumento 25x), se los categorizó como transferibles (mórula tardía a blastocisto temprano) o no transferibles, inmediatamente se los transfirió a las receptoras por laparoscopia, al cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo y de a un embrión por oveja, conformando así cuatro grupos: SinS (embriones Suffolk en madres Suffolk - control de genotipo grande), SinC (embriones Suffolk en madres Cheviot – embrión de genotipo grande en madre pequeña), CinS (embrión Cheviot en madre Suffolk – embrión de genotipo pequeño en madre grande) y CinC (embrión Cheviot en madre Cheviot – control de genotipo pequeño).

Al día 19 de gestación 9 ovejas receptoras de cada grupo fueron sacrificadas y se les tomaron muestras endometriales del tercio medio del cuerno uterino ipsilateral al CL, las que fueron fijadas en paraformaldehído al 4 % e incluidas en parafina para el análisis inmunohistoquímico, mientras que otras fueron puestas en N₂ líquido y conservadas a -80°C para el análisis por PCR.

5.2.1. Determinación de transcritos

El ARN total del tejido endometrial fue extraído usando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguido de precipitación con cloruro de litio y tratamiento con DNasa con el kit DNA-Free™ 180 (Ambion, Austin, TX, USA). La concentración de ARN fue determinada por espectrofotometría a

260nm, la pureza se determinó por la relación de la absorbancia 260nm/280nm y la integridad por electroforesis en gel (gel de agarosa al 1%). Para cada muestra el DNAc fue sintetizado por transcripción reversa usando transcriptasa SuperScript III (Invitrogen) con primers oligo-dT.

Las secuencias y longitud del producto esperado de los primers para cada uno de los genes a estudiar (*PR*, *ER α* , *IGF-1*, *IGF-2*, *IGFBP 1 a 6*, *IGFR1*, *ADIPOR1/R2*, *INSR*, *PTGS2*, *MUC-1*) y los controles endógenos hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HPRT), proteína ribosomal L19 (RPL19) y β -actina, se presentan en la Tabla 1. Las reacciones de PCR fueron realizadas utilizando 7,5 μ L de SYBER® Green master-mix (Quantimix EASY SYG kit, Biotools B&M Labs, Madrid, Spain), en cantidad equimolar a la cantidad de primer forward y reverse utilizada (200 nM, Operon Biotechnologies GmbH, Cologne, Germany), y 3 μ L de DNAc diluido (1:7,5 en agua libre de ARNasa/DNasa) en un volumen final de 15 μ L. Las muestras se analizaron en duplicado en un disco de 72 pocillos en Rotor-Gene™ 197 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia). Las condiciones de amplificación fueron 3 min a 95°C y 40 ciclos de 15s a 95°C, 40s a 60°C y 10s a 72°C. Al final de cada corrida, las curvas de disociación fueron analizadas para asegurarse de estar obteniendo el amplicón deseado y descartar la contaminación por ADN o dímeros de primers. Las muestras de DNAc de ocho ovejas (dos de cada grupo) fueron “pooleadas” para servir de control exógeno y cinco diluciones (desde 100 a 6.25 ng/ tubo) de este “pool” se usaron para conformar la regresión lineal de cada una. La eficiencia (E) del ensayo se calculó de acuerdo a la fórmula $E = (10^{-1/\text{pendiente}})^{-1}$; Tabla 1; Rutledge y Cote, 2003). La expresión génica fue determinada por la cuantificación relativa (Pflaffl, 2009) a los controles exógenos y la normalización geométrica de la expresión de los mismos (HPRT y RPL19), tomando en cuenta las eficiencias respectivas (Pflaffl, 2009).

Tabla I. Secuencia de primers, longitud de esperada del amplicón y eficiencia de las reacciones de qPCR.

Gen	Número de identificación	Secuencia del primer	Longitud (pb)	Eficiencia	Referencias
<i>PR</i>	Z66555	F GACAGCACTTTCTAGGCCGATAT R TGTGCTGGAAGAAACGATTGC	79	1.10	Sosa et al., 2009
<i>ERα</i>	AYO33393	F AGGGAAGCTCCTATTTGCTCC R CGGTGGATGTGGCTTCTCT	234	1.15	Sosa et al., 2009
<i>IGF-1</i>	NM_001009774.3	F TTGCACTTCAGAAGCAATGG R ACTGGAGAGCATCCACCAAC	209	0.99	De Brun et al., 2014
<i>IGFR1</i>	NM_001244612.1	F GACCATCAAAGCTGGGAAAA R TTATGTCCCCTTTGCTCTGG	116	1.01	De Brun et al., 2014
<i>IGF-2</i>	NM_001009311.1	F ACCCTCCAGTTTGTCTGTGG R GGGGTATGCTGTGAAGTCGT	210	1.05	De Brun et al., 2014
<i>IGFBP1</i>	NM_174554.3	F TCAAGAAGTGAAGGAGCCCT R AATCCATTCTTGTTCAGTTT	127	1.15	Fenwick et al., 2008
<i>IGFBP2</i>	NM_174555.1	F ATGCGCCTTCCGGATGA R GTTGTACAGGCCATGCTTGCA	74	1.11	Astessiano et al., 2012
<i>IGFBP3</i>	AF305199.1	F AGCACAGACACCCAGAATTCT R TTCAGCGTGTCTCCATTTC	86	1.11	Wu SH et al., 2004
<i>IGFBP4</i>	S77394.1	F ATGTGCCTGATGGAGAAAGG R AAGGCAGAGCCACAGACAGT	98	0.49	De Brun et al., 2014
<i>IGFBP5</i>	NM_001129733.1	F GGTTTGCCTGAACGAAAAGA R CTGGGTCAGCTTCTTTCTGC	193	1.04	De Brun et al., 2014
<i>IGFBP6</i>	AY197339	F GGAGAGAATCCCAAGGAGAGTAA R GAGTGGTAGAGGTCCCGAGT	100	0.69	Fenwick et al., 2008
<i>ADIPOR1</i>	NM_001034055.1	F GGCTCTACTACTCTTTCTAC R ACACCCCTGCTCTTGTCTG	154	1.20	De Brun et al., 2014
<i>ADIPOR2</i>	NM_001040499.2	F GGCAACATCTGGACACATC R CTGGAGACCCCTTCTGAG	203	1.15	De Brun et al., 2014
<i>INSR</i>	XM_004008038.1	F TGGCTCCTACAGCTGGACAGT R TCAGCACCCAGGATGGTT	86	1.16	De Brun et al., 2014
<i>PTSG2</i>	X9233D04/5	F CCAGGGCACAAATCTGATGTT R TGGTCCTCGTTCAAATCTGTCT	82	0.80	Sosa et al., 2009
<i>MUC-1</i>	XM_012107297.1	F ATGCCAGTTTCCTTCTCTCT R TGTCCAGCTGCTCACATTC	159	1.01	Thispaper
<i>RPL19</i>	NM_001040516.1	F CCCCAATGAGACCAATGAAATC R CAGCCCATCTTTGATCAGCTT	119	1.20	Chen Y, et al., 2006
<i>HPRT</i>	XM_580802	F TGGAGAAGGTGTTTATTCCTCATG R CACAGAGGGCCACAATGTGA	105	0.84	Carriquiry et al., 2009
<i>β-actina</i>	U08283	F CGAGCACGATGAAGATC R CCTCCGATCCACACCGAGTA	64	1.03	Chen Y, et al., 2006

5.2.2. Localización proteica y análisis de imagen

La inmunoreactividad de las proteínas de interés en el tejido uterino del cuerno ipsilateral al CL se visualizó en secciones transversas de 5 μ m, usando la técnica inmunohistoquímica de avidina-biotina-peroxidasa (Meikle et al., 2000). Las secciones de tejido se desparafinaron y rehidrataron mediante lavados en concentraciones decrecientes de etanol (100, 95, 75%). Luego fueron puestas en citrato de sodio 0,01M (pH 6.0) y llevadas al microondas por 4,5 min para mejorar la exposición de los antígenos. Los restantes pasos se realizaron a temperatura ambiente. Una vez retiradas del microondas y habiéndolas dejado enfriar, se las lavó con PBS (0,01M, pH 7,5) y la actividad no específica de las peroxidasas endógenas fue

bloqueada con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol, por 10 min. Nuevamente se las lavó por 10 minutos con PBS y fueron incubadas en suero normal de caballo (NHS) (Vector laboratories, Burlingame, CA, United States) por 60 minutos en cámara húmeda. Luego, fueron incubadas durante 1 hora con anticuerpo primario, monoclonal de ratón anti-ER α (Santa Cruz, Los Angeles, CA, USA), anti-PCNA (Santa Cruz Biotechnology), anti-PR (Zymed, San Francisco south, CA, USA), policlonal de cabra anti-IGF-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), policlonal de conejo anti-IGF-1R (abcam, England, United Kingdom) y anti-PTGS2 (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) diluïdos 1:25, 1:75, 1:100, 1:50, 1:100 y 1:200 en PBS respectivamente. El control negativo fue generado reemplazando el anticuerpo primario con IgG homólogo no inmune en concentraciones equivalentes (Santa Cruz). Luego de la unión del anticuerpo primario, las muestras se incubaron con anticuerpo secundario IgG biotinilado (Vector laboratories, Burlingame, CA, United States) anti-ratón (ER α , PCNA, PR), anti-cabra (IGF-1) o anti-conejo (IGFR1, PTGS2) diluïdo en 1:200 en suero normal de caballo o cabra. El kit Vectastain ABC (Vector Laboratories) se usó para detectar las proteínas y la localización de la enzima unida se visualizó con 3, 3-diaminobenzidina en H₂O₂ (DAB kit; Vector Laboratories) y finalmente las muestras fueron contra teñidas con hematoxilina y deshidratadas con concentraciones crecientes de etanol (75, 95, 100%) antes de montarlas en los portaobjetos.

La intensidad de tinción fue evaluada en cinco compartimentos; epitelio luminal, epitelio glandular (dividido arbitrariamente en dos compartimentos; epitelio glandular superficial cercano al lumen uterino, y epitelio glandular profundo cercano al miometrio), y estroma inter-caruncular (también dividido en superficial y profundo usando el criterio anterior). La cantidad de proteína inmunoreactiva en los diferentes tipos celulares se estimó subjetivamente por dos observadores independientes, quienes fueron cegados en cuanto a los grupos. Se analizaron diez campos en microscopio óptico (x1000) para todas las ovejas. La tinción fue clasificada en negativa (-), leve (+), moderada (++) o intensa (+++) y la intensidad de tinción de cada tipo celular fue expresado en la escala de 0 a 10 (Thatcher et al., 2003), donde 0 denota ausencia de tinción y 10 es la máxima intensidad de tinción. El promedio de intensidad de tinción fue calculada como $(1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3)$, donde n es el número de células por campo exhibiendo tinción leve (n_1), moderada (n_2) e intensa (n_3 ; Boos et al., 1996).

5.3. Análisis Estadístico

El análisis estadístico fue realizado en el programa SAS (SAS, Cary, NC, USA). La tasa de ovulación y número de embriones se analizó con el procedimiento GENMOD, incluyendo la raza en el modelo estadístico. Un análisis de univarianza se realizó para todas las variables para poder identificar valores atípicos e inconsistencias, y para verificar la normalidad de los residuales. Para las mediciones uterinas y ováricas se usó el PROC MIXED y el modelo estadístico incluyó la raza como efecto fijo. La concentración hormonal se analizó por medidas repetidas con PROC MIXED, con día de preñez como efecto repetitivo y una apropiada estructura de

covarianza (auto-regresión de primer orden AR (1)). Se incluyeron como efectos fijos la raza de la oveja, el día de muestreo y su interacción. Para las concentraciones de P₄ el número de CL (1 o ≥ 2) también se incluyó como covariable. La tasa ovulatoria no fue significativa como covariable para ninguna de las demás hormonas, por lo que fue removida del modelo.

Para PCR, todas las variables estuvieron sujetas a análisis de varianza incluyendo en el modelo raza del embrión, raza de la oveja y la interacción de ambas como efectos fijos, y el plato de PCR como efecto aleatorio. La intensidad de tinción promedio de los 10 campos también estuvo sujeta al análisis de varianza con PROC MIXED y se incluyó como efectos fijos la raza de la oveja, raza del embrión, tipo celular (epitelio luminal, epitelio glandular superficial y profundo, estroma superficial y profundo) y la interacción de éstos. El test de Tukey-Kramer fue utilizado para analizar las diferencias entre grupos. Los datos se presentan como la media de los mínimos cuadrados ± el promedio de los errores estándares. El nivel de significancia fue considerado como $p \leq 0,05$, y tendencia como $0,05 > p > 0,10$.

6. RESULTADOS

6.1. Experimento 1

La tasa ovulatoria y el número de embriones no fue significativamente diferente entre ovejas Suffolk y Cheviot ($p= 0,37$).

Si bien el útero y los ovarios de las ovejas Suffolk fueron más pesados que los de las ovejas Cheviot ($p= 0,03$ y $p < 0,01$, respectivamente), el útero de las ovejas Cheviot tendió a ser de mayor longitud ($p= 0,06$).

Tabla II. Peso y longitud del útero y ovarios, y tasa ovulatoria de ovejas Suffolk y Cheviot en la gestación temprana.

Mediciones	Suffolk	Cheviot	p valor
Tasa ovulatoria/Número de embriones	1.50 ± 0.20	1.75 ± 0.18	0.37
Peso uterino (g)	45.0 ± 1.6	39.1 ± 1.6	0.03
Largo uterino (cm)	52.9 ± 2.8	66.7 ± 2.6	0.06
Peso ovárico (g)	4.60 ± 0.17	3.68 ± 0.16	<0.01

6.1.1. Perfiles endócrinos

Las concentraciones de P₄ se vieron afectadas por la raza de la oveja, el día de gestación y la interacción ($p= 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente). Las ovejas Cheviot tuvieron mayores concentraciones que las ovejas Suffolk desde el día 6 al 21 ($8,9 \pm 0,6$ y $7,4 \pm 0,7$ ng/mL, respectivamente; Figura 4) las que aumentaron progresivamente hasta día 14 y luego disminuyeron

hasta el día 20 en ambas razas. Las concentraciones de P₄ también fueron afectadas por la tasa ovulatoria, de tal forma que las ovejas con doble CL presentaron mayores concentraciones ($p < 0,01$).

Las concentraciones plasmáticas de insulina se vieron afectadas por la raza y el día de toma de la muestra ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente), pero su interacción no fue significativa. Las ovejas Cheviot presentaron mayores concentraciones ($26,8 \pm 1,9$ vs $20,1 \pm 2,2$ $\mu\text{UI}/\text{mL}$, respectivamente) desde el día 4 al 20 (Figura 4) y en los días 6, 10 y 16 presentaron un aumento que fue más evidente.

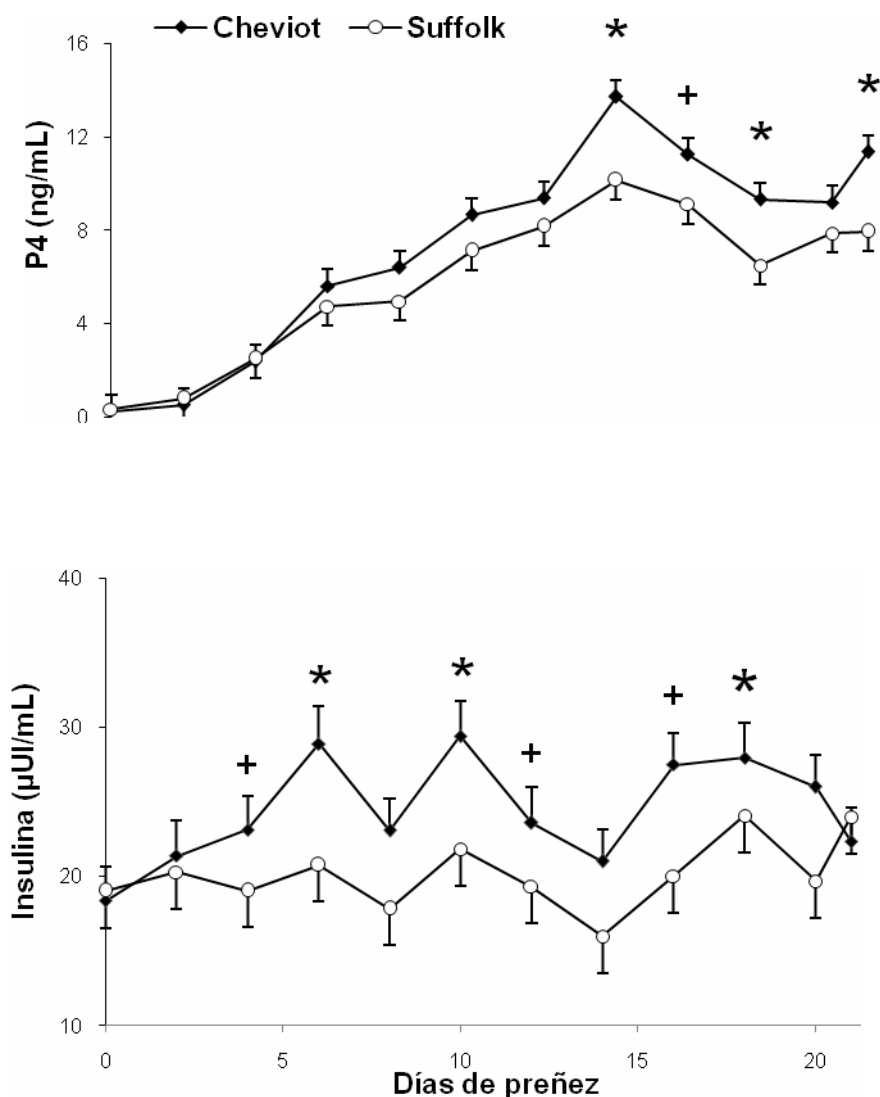


Figura 4. Concentraciones séricas de progesterona (P₄) e insulina en ovejas Suffolk y Cheviot desde el día 0=IA al 21 de preñez. Donde * = diferencia y + = tendencia.

El día de muestreo también afectó las concentraciones de IGF-1 ($p < 0,01$), pero no se encontraron diferencias entre razas (Figura 5). Las mayores concentraciones se vieron en el día 2 de gestación.

Para adiponectina las concentraciones tendieron a verse afectadas por la raza ($p < 0,10$), las ovejas Suffolk mostraron una tendencia a tener mayores concentraciones que las Cheviot ($4,43 \pm 1,03$ vs $2,07 \pm 0,81$ ng/ mL, respectivamente; Figura 5).

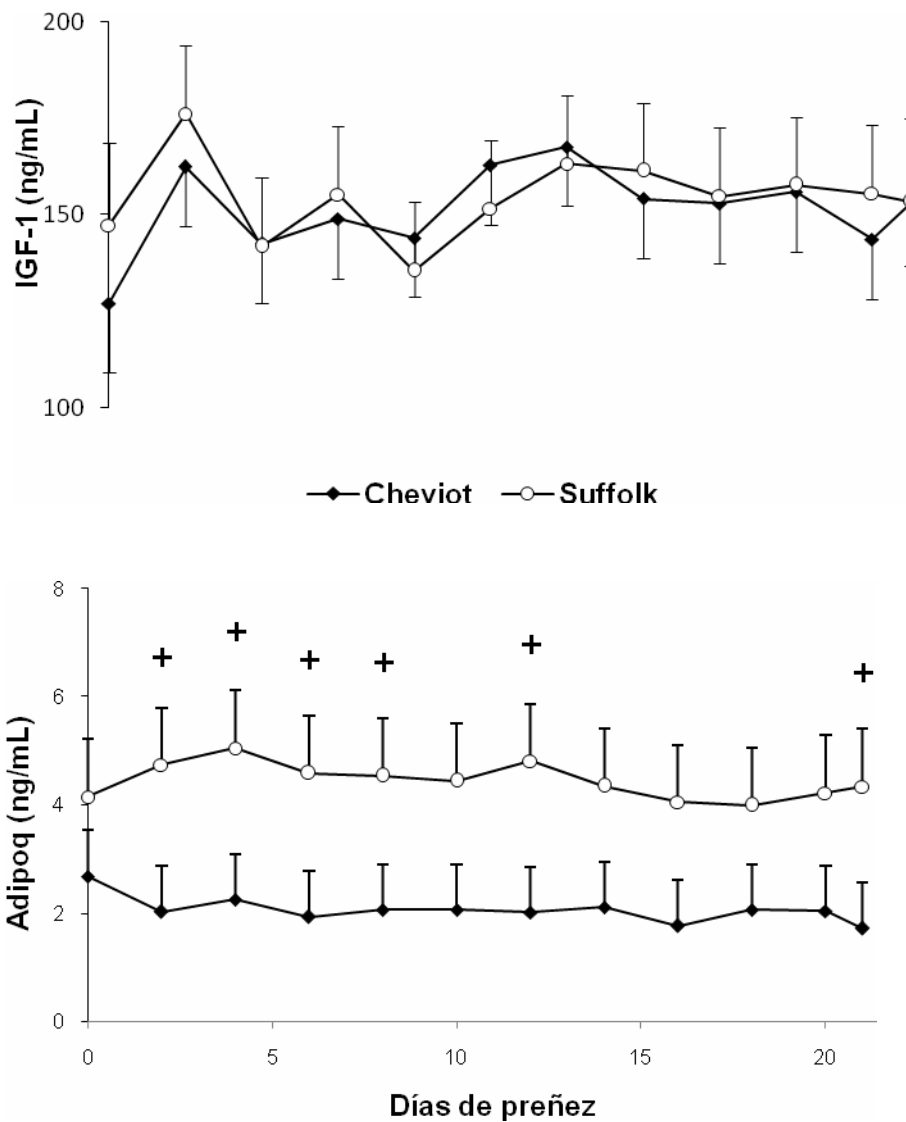


Figura 5. Concentraciones séricas de IGF-1 y adiponectina (Adipoq) en ovejas Suffolk y Cheviot desde el día 0= IA al 21 de preñez. Donde * = diferencia y + = tendencia.

6.2. Experimento 2

6.2.1. Expresión génica

La expresión de *PR* se vió afectada por la raza de la oveja, las ovejas Suffolk presentaron mayor expresión que las Cheviot ($0,7 \pm 0,4$ vs $0,4 \pm 0,3$, $p=0,04$, Figura 6A). La raza del embrión no afectó la expresión de *PR*, y no se encontraron interacciones. Cuando se compararon los grupos (Tukey-Kramer) las ovejas Cheviot con embriones Suffolk presentaron ($p < 0,05$) o tendieron a presentar ($p < 0,10$) menor expresión de *PR* que ovejas Suffolk con embriones Cheviot o Suffolk, respectivamente. Un patrón similar se observó para *IGF-1*, *IGFBP2* y *IGFBP5* con una mayor expresión en ovejas Suffolk ($1,2 \pm 0,2$ vs $0,6 \pm 0,3$, $p= 0,02$; $1,0 \pm 0,3$ vs $0,6 \pm 0,3$, $p= 0,03$ y $0,8 \pm 0,2$ vs $0,4 \pm 0,2$, $p= 0,01$, respectivamente), sin otros efectos significativos. Se observó una interacción entre la raza de la madre y la del embrión para *IGF2* e *IGFBP3* ($p= 0,02$ y $p= 0,09$, respectivamente; Figura 6B, D): por lo cual ovejas Cheviot con embriones Cheviot tuvieron mayor expresión de *IGF2* e *IGFBP3* que ovejas Cheviot con embriones Suffolk; no se encontraron diferencias en ovejas Suffolk. Aunque los efectos fijos no afectaron la expresión de *IGFR1*, cuando se usó el test de Tukey-Kramer, la expresión tendió ($p=0.09$) a ser mayor en ovejas Suffolk con embriones Cheviot comparadas con las mismas cargando embriones de su propia raza (Suffolk) y con ovejas Cheviot con embriones Suffolk. La raza embrionaria tendió a afectar la expresión de *PTGS2*, se encontró una mayor expresión en ovejas con embriones Cheviot que en ovejas con embriones Suffolk ($1,0 \pm 0,4$ vs $0,6 \pm 0,3$, $p= 0,07$). No se encontraron diferencias para *ER α* , *INSR*, *IGFBP1*, *IGFBP4*, *IGFBP6*, *AdipoR1*, *AdipoR2* y *MUC-1* (Tabla 3).

Tabla III. Expresión génica endometrial relativa al día 19 de preñez en ovejas Cheviot cargando embriones Cheviot y Suffolk (CinC y SinC, respectivamente) y ovejas Suffolk cargando embriones Cheviot y Suffolk (CinS y SinS, respectivamente).

<i>Gen</i>	<i>Grupo</i>				<i>SEM</i>
	<i>CinC</i>	<i>SinC</i>	<i>SinS</i>	<i>CinS</i>	
<i>REα</i>	0.44	0.35	0.40	0.53	0.13
<i>INSR</i>	0.71	0.64	0.82	0.81	0.13
<i>IGFBP1</i>	0.06	0.07	0.05	0.05	0.02
<i>IGFBP4</i>	0.64	0.67	0.99	0.75	0.18
<i>IGFBP6</i>	0.99	0.76	1.23	1.04	0.15
<i>ADIPOR1</i>	0.15	0.11	0.18	0.17	0.05
<i>ADIPOR2</i>	0.78	0.58	0.56	0.67	0.08
<i>MUC-1</i>	0.04	0.05	0.07	0.04	0.01

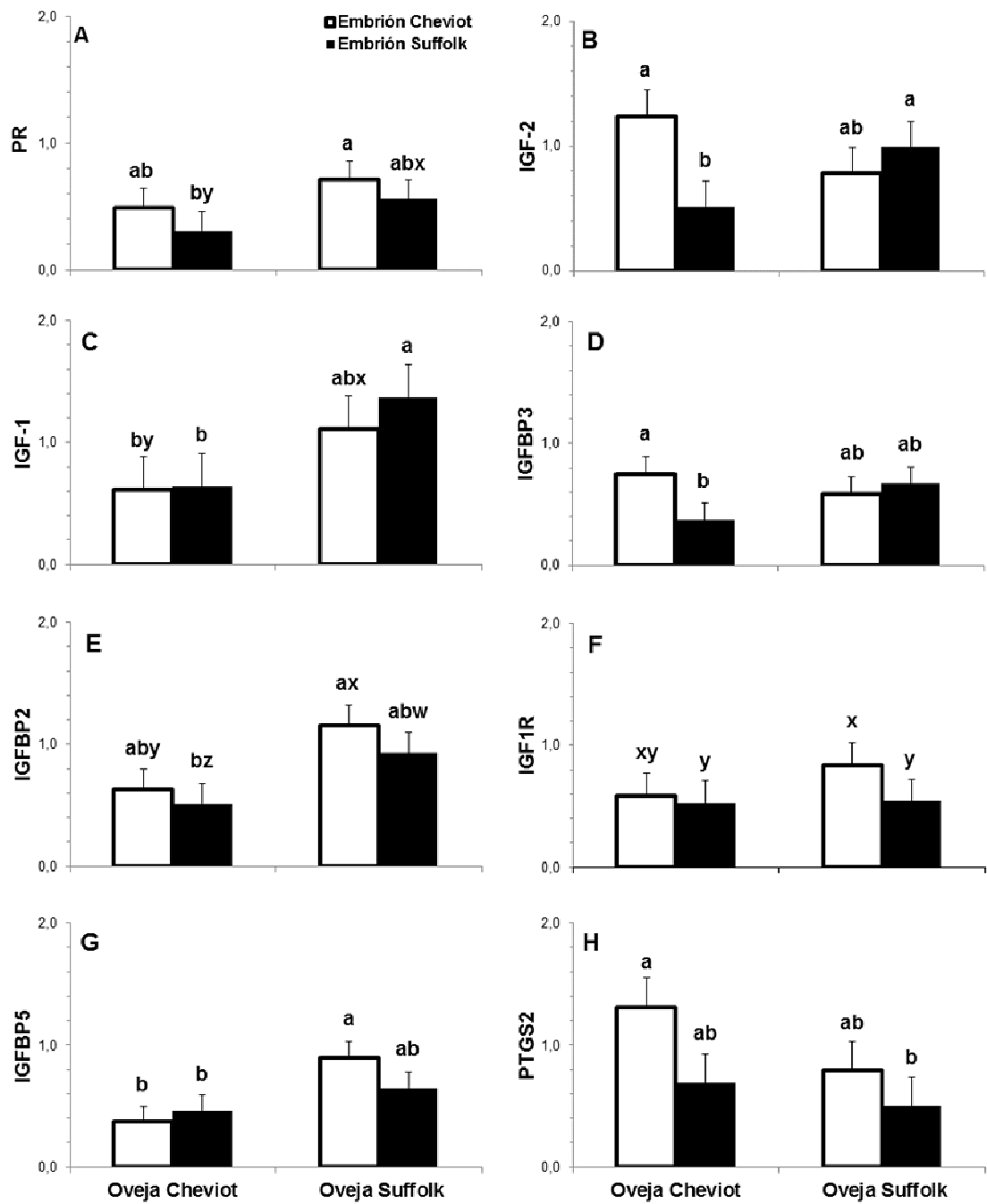


Figura 6. Expresión relativa de ARNm de *RP* (A), *IGF-2* (B), *IGF-1* (C), *IGFBP3* (D), *IGFBP2* (E), *IGFR1*(F), *IGFBP5* (G) y *PTGS2* (H) en ovejas Cheviot y Suffolk con embriones Suffolk o Cheviot.
a vs b indica diferencias significativas ($p < 0.05$), w, x, y, z indica una tendencia $0.05 < p < 0.10$.

6.2.1. Expresión proteica

El PR, ER α y PCNA se localizaron en el núcleo de las células endometriales, mientras que PTGS2, IGF-1 e IGFR1 fueron localizados en el citoplasma (Figura 7). Al sustituir los anticuerpos con IgG no inmune, la ausencia de tinción confirmó la alta especificidad de la tinción.

Para PR y ER α no se observó tinción en el epitelio luminal, y una tinción muy tenue se observó en las glándulas superficiales y profundas, mientras que en el estroma superficial y profundo se observó una tinción positiva. La interacción entre raza de la ovejas, raza del embrión y tipo celular afectó la intensidad de tinción de PR ($p= 0,01$), las ovejas Suffolk con embriones Cheviot presentaron mayor tinción en el estroma superficial que en el DS (Tabla 4), los demás grupos no presentaron diferencias en la tinción entre tipos celulares. El ER α fue afectado por la raza de la oveja, las ovejas Cheviot presentaron una mayor tinción que las ovejas Suffolk ($0,7 \pm 0,1$ vs $0,3 \pm 0,1$, $p= 0,04$, Tabla 4); y no se encontraron otros efectos.

Para IGF-1 no se observó tinción en las glándulas profundas, y la tinción en el epitelio glandular, estroma superficial y profundo fue 2 a 3 veces mayor que en las glándulas superficiales ($p< 0,01$, Tabla 4). Se observó una interacción entre la raza del embrión y la raza de la oveja ($p= 0,09$), las ovejas Cheviot con embriones Suffolk tendieron a presentar mayor intensidad de tinción que las ovejas Cheviot con embriones Cheviot. Este hallazgo se dió de forma inversa en las ovejas Suffolk, las que cargando embriones de su misma raza presentan menor intensidad de tinción de IGF1 que las ovejas Suffolk con embriones Cheviot. La tinción para IGFR1 fue observada en todos los tipos celulares, pero, fue más notoria en glándulas superficiales y profundas y epitelio luminal ($p< 0,01$, Tabla 4). No se encontraron otras diferencias para IGFR1.

Para PTGS2 se observó tinción en el epitelio luminal y glándulas superficiales en todos los grupos. Las ovejas Suffolk con embriones Cheviot mostraron tinción de PTGS2 en el estroma superficial mientras que este tipo celular no presentó positividad en los otros grupos (datos no mostrados). La raza de la oveja tendió a afectar la intensidad de tinción de PTSG2 (Tabla 3), las ovejas Suffolk presentaron mayor intensidad de tinción que las ovejas Cheviot ($1,13 \pm 0,07$ vs $0,96 \pm 0,06$, $p< 0,10$). La interacción entre la raza de la oveja y del embrión afectó la intensidad de tinción de PTGS2 ($p< 0,01$), las ovejas Cheviot con embriones Suffolk tuvieron menor intensidad de tinción en el epitelio luminal que las ovejas Suffolk con embriones Suffolk ($0,83 \pm 0,08$ vs $1,24 \pm 0,10$, $p= 0,03$); no se encontraron diferencias para ovejas con embriones Cheviot.

Se observó una tinción positiva de PCNA en el epitelio luminal y glándulas superficiales, mientras que fue indetectable en las glándulas profundas y estromas superficial y profundo. La intensidad de tinción se vió afectada por la interacción entre la raza del embrión y la de la oveja (Tabla 4): las ovejas Suffolk con embriones Suffolk tendieron a presentar ($p= 0,06$) menor intensidad de tinción de PCNA que las ovejas Cheviot con embriones Suffolk; no se observaron diferencias para ovejas con embriones Cheviot.

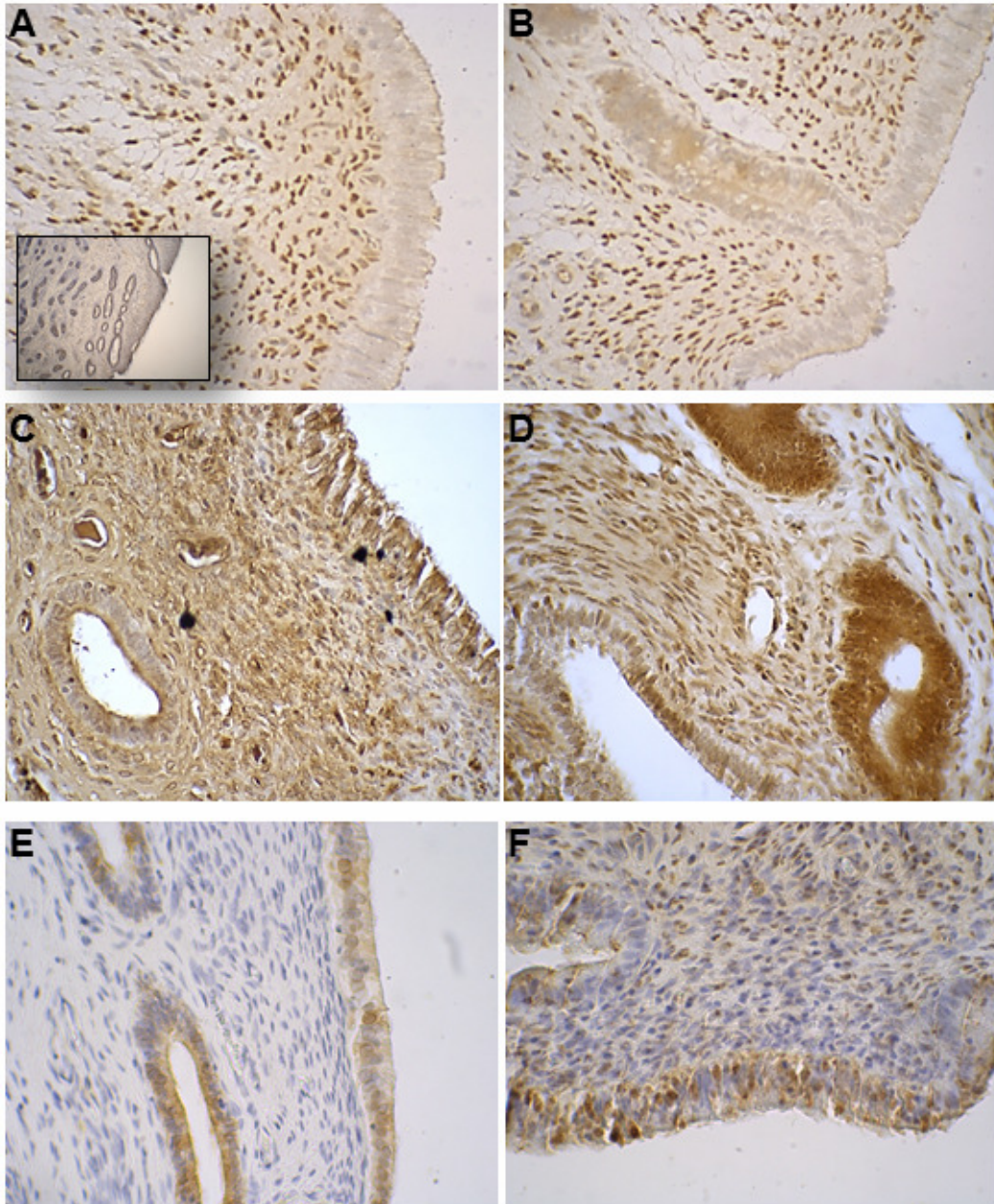


Figura 7. Ejemplos de la localización inmunohistoquímica de PR (A), ER α (B), IGF-1(C), IGFR-1(D), PTSG2 (E) y PCNA (F) al día 19 de gestación.

Tabla IV. Intensidad de tinción promedio en el endometrio de ovejas Suffolk y Cheviot al día 19 de gestación, gestando embriones Suffolk o Cheviot.

Proteína	Tipo celular	Grupo				SEM	Embrión	Oveja	Embrión*Oveja
		CinC	SinC	CinS	SinS				
PR	SS	0.73	0.93	0.90	0.80	0.08	NS	NS	NS
	DS	0.76	0.93	0.49	0.81	0.08			
ER α	SS	0.55	0.53	0.15	0.50	0.13	NS	0.04	NS
	DS	0.86	0.86	0.31	0.40	0.12			
IGF-1	LE	1.12	1.39	1.24	1.05	0.14	NS	NS	0.09
	SS	1.15	1.34	1.14	0.93	0.15			
	DS	1.14	1.17	1.14	1.01	0.16			
IGFR1	SG	0.41	0.55	1.39	0.36	0.17	NS	NS	NS
	LE	1.02	0.90	1.29	0.95	0.14			
	SS	0.92	0.87	0.67	0.74	0.14			
	DS	0.81	0.53	0.80	0.71	0.14			
	SG	1.41	1.46	1.19	1.37	0.14			
PTGS2	LE	1.14 ^{ab}	0.89 ^b	1.17 ^{ab}	1.60 ^a	0.13	NS	0.08	0.01
	SG	1.04	0.78	0.86	0.88	0.12			
PCNA	LE	1.44	1.39	1.53	1.25	0.16	NS	NS	0.04
	SG	1.12 ^{xy}	1.40 ^x	1.67 ^{xy}	0.63 ^y	0.16			

7. DISCUSIÓN

En el primer experimento, las ovejas de la raza Cheviot presentaron un perfil de concentraciones de P₄ más altas que las Suffolk durante la gestación temprana. Por otro lado, Sharma et al. (2013), no encontraron diferencias entre estas mismas razas durante la gestación tardía (específicamente en los días 50, 90, 120 y 140). Además de que la diferencia entre ambos estudios fueron los días de gestación, se debe tener en cuenta que la mayor frecuencia (día por medio) en nuestro estudio pudo haber permitido una mayor precisión para detectar diferencias acorde a la raza. La mayor concentración de P₄ observada en las ovejas Cheviot no puede ser explicada por la tasa ovulatoria, ya que si bien el número de ovulaciones afecta significativamente los valores de P₄ (Ashworth et al., 1989), en nuestro trabajo no encontramos diferencias en la tasa ovulatoria entre estas razas. En esta tesis las concentraciones de P₄ decrecieron desde el día 14 al 20 en ambas razas y no estamos al tanto de la existencia de reportes que expliquen estos hallazgos. Sheldrick y Flint (1983) estudiando las concentraciones de oxitocina durante la gestación temprana en la oveja

encontraron un perfil de P_4 similar al nuestro, asociado al incremento de oxitocina, pero no dieron una interpretación para ello.

La P_4 modula el desarrollo embrionario mediante la estimulación de la expresión de varias proteínas, incluyendo factores de crecimiento y proteínas de unión en el útero ovino (Satterfield et al., 2006), lo que a su vez incrementa la concentración de glucosa uterina, el principal combustible del embrión (Rieger et al., 1992; Satterfield et al., 2010). Davis et al. (1986) reportaron un aumento en las tasas de preñez con tratamientos de P_4 , mientras que Smith et al. (1985) no observaron diferencias en la sobrevivencia embrionaria luego de un tratamiento con P_4 . La aparente existencia de una tasa óptima intermedia de aumento de las concentraciones de P_4 debe ser más importante que la concentración en sí, ya que las tasas más rápidas o más lentas de crecimiento implican un mayor grado de asincronía entre el embrión y la oveja a medida que avanza la preñez (Ashworth et al., 1989). Por otro lado, si bien las ovejas Cheviot presentaron mayores concentraciones de P_4 circulantes que las ovejas Suffolk (Experimento 1), esto puede no estar reflejando la concentración real de P_4 a nivel uterino y/o la acción hormonal en este tejido. De hecho, se ha demostrado que las ovejas subnutridas presentan mayores concentraciones periféricas de P_4 (Rhind et al., 1985; Abecia et al., 1996), pero una reducción en la concentración endometrial (Lozano et al., 1998), consistente con una baja expresión endometrial de receptores de progesterona (PR; Sosa et al., 2004, 2006) y un deterioro en el desarrollo embrionario temprano (Abecia et al., 1995). Si bien la expresión de ARNm puede no siempre reflejar la concentración real de la proteína, la mayor expresión uterina de ARNm de PR en las ovejas Suffolk (Experimento 2), apoya la hipótesis de que la concentración de P_4 circulante no es un buen reflejo de la sensibilidad uterina a la misma. Aunque las concentraciones de P_4 circulantes han sido el centro en las investigaciones que intentan explicar el desarrollo embrionario y/o las tasas de preñez en rumiantes (Mann y Lamming, 2001; Spencer et al., 2004; Satterfield et al., 2006), los resultados combinados de los trabajos de esta tesis sugieren que la sensibilidad endometrial a la P_4 (concentración de PR) es uno de los principales factores asociados al crecimiento embrionario.

Las mayores concentraciones de P_4 en ovejas Cheviot se acompañaron con concentraciones más altas de insulina (Experimento 1). Esto es consistente con reportes donde se demostró que la insulina estimula la producción de P_4 por parte de las células de la granulosa al interactuar con el receptor de IGF tipo 1 (Spicer y Echterkamp, 1995). Sin embargo, las concentraciones de IGF-1 no se vieron afectadas por la raza ni tampoco por el número de ovulaciones. Spicer et al. (1993) demostraron que las concentraciones plasmáticas de IGF-1 se encuentran bajo control genético, dado que las ovejas de raza Finn presentaron mayores concentraciones de IGF-1 que las Cambridge, sin embargo, no se encontró asociación genética con la tasa ovulatoria. De forma similar, en un estudio previo (Ashworth et al., 1989), en el cual el número de ovulaciones varió entre 1,6 y 3,8, no se encontraron diferencias en las concentraciones circulantes de IGF-1, reportándose si mayor contenido de ARNm de IGF-1 en el ovario de ovejas con mayor tasa ovulatoria. Tomando esto en cuenta, es posible postular que

a pesar de que las concentraciones circulantes de IGF-1 no difieren según la raza, la producción local (en esta tesis, útero) si puede diferir. De hecho en el Experimento 2, la expresión uterina de *IGF-1* fue en el mismo sentido que la expresión de *PR*, (mayor en ovejas Suffolk), lo que está de acuerdo con la sugerencia de que la expresión endometrial de *IGF-1* es regulada en primera instancia por la acción de la P_4 (Satterfield et al., 2010). La mayor expresión de *IGF-1* en las ovejas Suffolk es consistente con el mayor crecimiento de estos embriones (Fermín et al., 2014) y con estudios embrionarios *in vitro* que han mostrado la existencia de mayores tasas de preñez al ser tratados con IGF-1 durante el estadio de blastocisto (Block and Hansen, 2007). Por otro lado, las vacas preñadas, al día 17 presentan mayor expresión endometrial de *IGF-1* que las vacas no preñadas (Kirby et al., 1996).

A diferencia de la P_4 y la insulina, las concentraciones de Adipoq fueron mayores en las ovejas Suffolk que en las Cheviot. Se sabe que la Adipoq aumenta la sensibilidad a la insulina (Saremi et al., 2014), reduce la gluconeogénesis, incrementa la glucosa y aumenta la beta-oxidación de los ácidos grasos en el hígado y músculo esquelético (Kadokawi et al., 2006). Por lo tanto, mayores concentraciones de Adipoq son consistentes con una menor concentración de insulina encontrada en ovejas Suffolk. Además, la Adipoq puede también estar jugando un papel importante en el desarrollo embrionario y la receptividad uterina de forma autócrina, parácrina y/o endócrina promoviendo la oxidación de ácidos grasos (Kim et al., 2011). En humanos, se han observado altos niveles de Adipoq durante la gestación temprana que mejoran la adquisición de nutrientes por parte de la madre, mientras que los bajos niveles de la misma han sido reportados en madres con diabetes mellitus gestacional con resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa (Irving et al., 2013). Entonces, bajos niveles de Adipoq en las ovejas Cheviot pueden estar asociados con un reducido desarrollo embrionario encontrado previamente en los embriones de esta raza, en un momento donde la capacidad uterina no es un factor limitante para el crecimiento embrionario (ej, día 19, Fermin et al., 2014). Dado que la acción hormonal en el tejido no sólo depende de la concentración circulante de la hormona, sino también de la sensibilidad del tejido a la hormona (contenido de receptores), determinamos los receptores de Adipoq en el útero (Experimento 2). Según nuestro conocimiento este es el primer reporte que mide la expresión génica de *AdipoR1* y *AdipoR2* en útero durante la preñez temprana en ovinos. La expresión uterina de los receptores de *Adipoq* no se vió afectada por la raza de la oveja o la del embrión. Desafortunadamente, en este trabajo no se incluyeron ovejas cíclicas para poder determinar el papel de esta hormona en la implantación, pero se ha sugerido que la Adipoq juego un papel importante en el desarrollo embrionario durante la pre implantación e implantación en ratones y humanos (Kao et al., 2002; Riesewijk et al., 2003; Mirkin et al., 2005; Kim et al., 2011).

Los perfiles endócrinos durante la preñez temprana del experimento 1 muestran que las ovejas Cheviot presentan concentraciones mayores de P_4 e insulina, pero menores de Adipoq respecto a las ovejas Suffolk, lo que puede condicionar un ambiente uterino diferencial para el crecimiento embrionario (Experimento 2). La mayor expresión uterina de *PR* y de *IGF-1*

en ovejas Suffolk fue consistente con el aumento encontrado en *IGFBP2*. Este hallazgo está de acuerdo con el aumento endometrial de esta proteína en novillas tratadas con P_4 (McCarthy et al., 2011). Una mayor abundancia de *IGFBP2* es observada durante la pre implantación tardía (Simmen et al., 1992), lo que implica un papel de esta proteína en el proceso de implantación. La regulación de *IGFBP2* es dependiente del tejido; mientras que no se observa efecto de la suplementación en la expresión de *IGFBP2* en hígado bovino, si se observó un incremento en el endometrio (Coyne et al., 2011). También se encontró una mayor expresión de *IGFBP5* en útero de ovejas Suffolk y dado que no sólo es un importante modulador fisiológico de IGF-1 e IGF-2, sino que además, se la ha vinculado con la inducción de la apoptosis (Gadd et al., 2000), sugerimos que este aumento en ovejas Suffolk puede favorecer el desarrollo embrionario observado previamente (Fermín et al., 2014).

Una interacción entre la raza de la oveja y la del embrión se encontró para *IGF-2* e *IGFBP3*, las ovejas Cheviot con embriones Suffolk presentaron menor expresión que las ovejas Cheviot con embriones de su propia raza, sin observarse diferencias en ovejas Suffolk. Estos datos son consistentes con los de Geisert et al. (1991) que reportaron niveles de expresión de *IGF-2* aumentados en endometrio bovino entre los días 15-18 de preñez, lo que estimula el crecimiento embrionario y la producción de IFN-t (Wathes et al., 1998). Además, Geisert et al. (1991) sugirieron que la expresión de *IGF-2* está regulada por el concepto. De acuerdo con esta última hipótesis, las ovejas Cheviot con embriones Suffolk tuvieron una menor expresión de *IGF-2*, lo que sugiere que desde muy temprano en la preñez el embrión Suffolk regula la expresión endometrial de *IGF-2* de acuerdo con la raza de la oveja (e.j. las ovejas Suffolk con embriones Suffolk tuvieron mayor expresión de *IGF-2*) y/o que el ambiente uterino es capaz de censar la raza del embrión. En ese sentido y como se mencionó anteriormente, también las ovejas Cheviot con embriones Suffolk (SinC) mostraron menor expresión de *PR* (es decir, un ambiente uterino menos favorable) lo cual apoya los hallazgos de Sharma et al. (2013) donde los embriones Suffolk que se desarrollaron en madres Cheviot fueron más pequeños que los que se desarrollaron en ovejas de su propia raza (SinS). En el mismo sentido, la expresión de *IGFBP3* menor en ovejas Cheviot con embriones Suffolk se asocia al rol estimulador de esta proteína y a su relevancia durante la preñez temprana ya que responde más a las señales embrionarias (Liu et al., 1995). La expresión de *IGFBP1*, *IGFBP4* e *IGFBP6* no se vió afectada por la raza del embrión o la oveja. Si bien es conocido el rol relevante de *IGFBP1* durante el período del reconocimiento materno de la preñez, ya que su expresión aumenta alrededor de este momento (día 12 al 16, Robinson et al., 2006), se puede proponer que no se observa efecto porque el día de gestación elegido (día 19, Experimento 2) fue posterior a la relevancia biológica sugerida.

No se observó tinción de *PR* y $ER\alpha$ en el epitelio luminal y fue muy poca en las glándulas superficiales y profundas. Esta regulación negativa ya se ha reportado anteriormente (Spencer y Bazer, 1995) y aparentemente es un prerrequisito para la receptividad uterina a la implantación (Bazer et al., 2010; Dharmaraj et al., 2010). La pérdida de expresión proteica de *PR* en el

epitelio luminal está directamente relacionada a la pérdida de la expresión de proteínas anti adhesivas, como MUC-1, que impiden la implantación (Spencer et al., 1999; 2004). No se observaron diferencias en la expresión génica de *MUC-1*, lo que concuerda con que en este momento (día 19) ya se está dando la adhesión del embrión al endometrio (Spencer et al., 2004). En contraste con la expresión génica, la expresión proteica de PR no difirió entre grupos; esto podría deberse al aumento en la sensibilidad del análisis con RT-qPCR respecto a la inmunohistoquímica y/o cambios postranscripcionales que haya sufrido la proteína. Una mayor intensidad de tinción de ER α se observó en el estroma de las ovejas Cheviot, para lo que no tenemos una explicación obvia. Es conocido que una sobreexpresión de ER α resulta en un mayor número de células apoptóticas en el epitelio endometrial y un descenso en el número de sitios de implantación en mujeres (Tomic et al., 2007).

La mayor tinción de antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en ovejas Cheviot con embriones Suffolk refleja una tasa de proliferación aumentada (Lai et al., 2000), que probablemente esté dando lugar a un desacoplamiento entre endometrio y el desarrollo del embrión como se ha postulado anteriormente (Martin et al., 2011). En efecto, se ha visto que la expresión de PCNA es elevada en el endometrio de roedores en los que los embriones no alcanzan la madurez o no tienen una implantación exitosa (Martin et al., 2011). De forma similar, la tinción de IGF-1 tendió a ser mayor en el tejido uterino de ovejas Cheviot con embriones Suffolk, embriones que tuvieron un crecimiento restringido (Sharma et al., 2013). Estos datos están de acuerdo con reportes en los que altas concentraciones de IGF-1 provocan una regulación a la baja del IGFR1 en blastocitos de ratones con un desarrollo retardado (Chi et al., 2000). Estas observaciones están de acuerdo con el menor contenido de ARNm de *IGF1R* en útero de ovejas Cheviot con embriones Suffolk. En conjunto, entonces, una excesiva expresión de factores mitogénicos (PCNA e IGF-1) puede estar asociado al retardado desarrollo embrionario que observó Sharma et al. (2013).

La intensidad de tinción de IGF-1 fue similar en el epitelio luminal y estromas pero muy baja en epitelio glandular, mientras que el IGFR1 se expresó intensamente en el epitelio luminal y glándulas como ya fue reportado con anterioridad en útero bovino (Robinson et al., 2006). Dado que el *IGF-1* se sintetiza principalmente en el estroma subyacente al LE (Stevenson, 1994; Reynolds et al., 1997), el hallazgo de su localización en epitelio luminal confirmaría la existencia de una “conversación” entre el estroma superficial y el epitelio luminal (es decir, si bien IGF-1 se expresa en el estroma, se une a su receptor en el epitelio luminal). Por otro lado, teniendo en cuenta que localizamos PR en las células estromales, lugar donde el ARNm de *IGF-1* se sintetiza (Robinson et al., 2006) y que la expresión génica de *PR* e *IGF-1* fue mayor en las ovejas Suffolk, entonces, podríamos sugerir que la funcionalidad del epitelio es mediada por el mecanismo de P₄-PR en el estroma subyacente que actúa sobre las células epiteliales, como ya se demostró previamente (Cook et al., 1997). Esta idea se ve reforzada por el mayor contenido del IGFR1 observado en el epitelio luminal y glándulas. En efecto, las respuestas uterinas a las señales

embrionarias que resultan en una implantación satisfactoria podrían ser el producto de la combinación de respuestas de todos los tipos celulares presentes en el útero.

La tinción de la PTSG2 se observó en el epitelio luminal y en las glándulas superficiales, consistente con lo que se ha reportado anteriormente en rumiantes (Sosa et al., 2009; Bianchi et al., 2013). Se ha postulado que las prostaglandinas (PGs) están involucradas en la adhesión del trofoblasto ovino al endometrio, y son necesarias para el aumento de la permeabilidad vascular en los sitios de implantación (Kennedy, 1980) y para el aumento en el flujo sanguíneo local (Hamilton y Kennedy, 1994). En efecto, la elongación del concepto ovino es consistente con la expresión génica de *PTGS2* en el epitelio endometrial y su propia producción de PGs (Kim et al., 2003). En el presente estudio las ovejas Cheviot con embriones Suffolk tuvieron una menor tinción de PTSG2 en el epitelio luminal que las ovejas Suffolk con embriones Suffolk, lo que podría explicar, en parte, el menor crecimiento que experimentan los embriones Suffolk en las madres Cheviot (Sharma et al., 2013).

Los datos de PR y los miembros de la familia de IGF son consistentes con un ambiente uterino que puede estar proveyendo una mayor estimulación sobre el crecimiento embrionario, la elongación y la implantación en ovejas Suffolk (mayor expresión de *PR*, *IGF1*, *IGFBP2* e *IGFBP5*) y además en las ovejas Suffolk con embriones Cheviot mayor expresión de *IGFR1*. Las ovejas Cheviot con embriones Suffolk mostraron un ambiente uterino de restricción; menor expresión génica de *IGF-2* e *IGFBP3*. Además, la expresión coordinada del sistema IGF influye en la composición de la leche uterina durante el período de desarrollo del concepto previo a la implantación (McCarthy et al., 2011). Ambos, madres y embrión modifican su interacción, resultando en un crecimiento embrionario diferenciado; es decir, una expresión diferencial de acuerdo a la raza de la madre estimula el crecimiento del concepto, pero también, la presencia del concepto modifica la expresión endometrial y estimula el transporte de aminoácidos al fluido luminal uterino. En efecto, un concepto con su desarrollo comprometido (ej. embrión Suffolk desarrollándose en un oveja Cheviot) puede presentar una reducida cantidad de aminoácidos en el fluido uterino y sus requerimientos nutricionales no ser cubiertos (Forde et al., 2014).

8. CONCLUSIONES

Los perfiles endócrinos durante la gestación temprana difieren de acuerdo a la raza, las ovejas Cheviot presentan mayores concentraciones de P4 e insulina, pero menores concentraciones de Adipoq que las ovejas Suffolk.

La expresión génica y proteica en el endometrio de ovejas Suffolk y Cheviot depende de la raza materna, pero también es afectada por la raza del embrión, incluso esta expresión ya sea proteica o génica se ve afectada por la interacción entre ambas razas, o sea, existe una comunicación útero-

concepto influenciada por las razas de ambos desde ya muy temprano en la gestación. Esto podría estar determinando qué madre es “mejor” para el crecimiento del embrión, dependiendo de la raza del mismo.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abecia J.A., Rhind S.M., Bramley T.A. y McMillen S.R. (1995). Steroid production and LH receptor concentrations of ovarian follicles and corpora lutea and associated rates of ova wastage in ewes given high and low levels of food intake before and after mating. *Anim. Sci* 60: 57-62.

Abecia J.A., Rhind S.M., Goddard P.J., McMillen S.R., Ahmadi S. y Elston D.A. (1996). Jugular and ovarian venous profiles of progesterone and associated endometrial progesterone concentrations in pregnant and non-pregnant ewes. *Anim. Sci* 63: 229-234.

Abecia J.A., Forcada F. y Zúñiga O. (2001). Differences in reproductive performance, embryo development, interferon-tau secretion by the conceptus and luteal function in ewe lambs synchronized in oestrus before or after the spontaneous onset of luteal activity preceding puberty. *Reprod Domest Anim.* 36 (2): 73-77.

Al-Gubory K.H., Arianmanesh M., Garrel C., Bhattacharya S., Cash P. y Fowler P.A. (2014). Proteomic analysis of the sheep caruncular and intercaruncular endometrium reveals changes in functional proteins crucial for the establishment of pregnancy. *Reproduction.* Apr 8;147(5): 599-614.

Allen W.R., Wilsher S., Stewart F., Ousey J. y Fowden A. (2002a). The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse: II. Endocrinology of pregnancy. *Journal of Endocrinology* 172: 237-246.

Allen W.R., Wilsher S., Turnbull C., Stewart F., Ousey J., Rossdale P.D. y Fowden A. (2002b). Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in uterus. *Reproduction* 123: 445-453.

- Allen W.R., Sandra W., Tiplody C. y Butterfield R.M. (2004). The influence of maternal size on pre and postnatal growth in the horse. II. Postnatal growth. *Reproduction* 127: 67-77.
- Ashworth C.J., Sales D.I. y Wilmut I. (1989). Evidence of an association between the survival of embryos and the periovulatory plasma progesterone concentration in the ewe. *J Reprod Fert* 87: 23-32.
- Astessiano A.L., Pérez-Clariget R., Quintans G., Soca P. y Carriquiry M. (2012). Effects of a short-term increase in the nutritional plane before the mating period on metabolic and endocrine parameters, hepatic gene expression and reproduction in primiparous beef cows on grazing conditions. *96(3)*: 535-444.
- Ayalon N. (1978). A review of embryonic mortality in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 15: 483- 493.
- Bazer F.W., Gu W., Spencer T.E, Johnson G.A, Burghardt R.C y Bayless K. (2010). Novel pathways for implantation and maintenance of pregnancy in mammals. *Mol Hum Reprod.* 16: 135-152.
- Bianchi C., Meikle A., Alvarez M., Cavilla M. y Aba A. (2013). Estrogen, Progesterone and Oxytocin Receptors and COX-2 Expression in Endometrial Biopsy Samples from the Induction of Ovulation to Luteolysis in Llamas (*Lama glama*). *Reprod Domest Anim* 48(Suppl. 4): 681-690.
- Block J. y Hansen P.J. (2007). Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of in vitro produced embryos following transfer to lactating dairy cows. *Theriogenology.* 67: 1518–1529.
- Boshier D. P. (1969). A histological and histochemical examination of implantation and early placentome formation in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility.* 19: 51-61.

- Brahmkhatri V.P., Prasanna C. y Atreya H.S. (2015). Insulin Like Growth Factor System in Cancer: Novel Targeted Therapies. *Biomed Res Int* 538019.
- Buratovich, O. (2010). Eficiencia reproductiva en ovinos: factores que la afectan. Parte II: Otros factores no nutricionales. *Carpeta Técnica, Ganadería N° 36. EEA. INTA. Esquel Chubut.*
- Burghardt R.C., Johnson G.A., Jaeger L.A., Ka H., Garlow J.E., Spencer T.E. y Bazer F.W. (2002). Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cells Tissues Organs* 171: 202-217.
- Cann C.H, Fairclough H.J, Sutton R. y Gow C.B. (1997). Endometrial expression of mRNA encoding insulin-like growth factors I and II and IGF-binding proteins 1 and 2 in early pregnant ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* 111: 7-13.
- Carriquiry M., Weber W.J., Fahrenkrug S.C. y Crooker B.A. (2009). Hepatic gene expression in multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation. *J Dairy Sci.* 92: 4889-4900.
- Carson D.D., Bagchi I., Dey S.K., Enders A.C., Fazleabas A.T., Lessey B.A y Yoshinaga K. (2000). Embryo implantation. *Developmental Biology* 223: 217-237.
- Chabrolle C., Tosca L. y Dupont J. (2007). Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. *Reproduction.* 133: 719-731.
- Chen, Y., J. A. Green, E. Antoniou, A. D. Ealy, N. Mathialagan, A. M. Walker, M. P. Avalle, C. S. Rosenfeld, L. B. Hearne, and R. M. Roberts. 2006. Effect of interferon-tau administration on endometrium of nonpregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. *Endocrinol.* 147: 2127-2137.

- Chi M. M., Schlein A.L. y Moley K.H. (2000). High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. *Endocrinol.* 141:4784–4792.
- Clark J. H., Schrader W. T. y O'Malley B. W. (1992). Mechanisms of action of steroid hormones. *Williams textbook of endocrinology* (8th ed). Philadelphia, W. B. Saunders Comp 35-90.
- Clark, J. H., y Mani, S. K (1994). Actions of ovarian steroid hormones. *The physiology of Reproduction*. Knobil, E. & Neill, J. D (eds). New York, Raven Press 1011-59.
- Clement M., de La Fuente J., Fair T., Al Naib A., Gutierrez-Adan A., Roche J.F., Rizos D. y Lonergan P. (2009). Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction* 138: 507-517.
- Cook P.S., Buchanan D.L., Yound P., Setiawan T., Brody J., Korach K.S., Taylor J., Lubahn D.B. y Cunha G.R. (1997). Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proc Nat Acad Sci USA* 94: 6535-6540.
- Coyne G.S., Kenny D.A. y Waters S.M. (2011). Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on bovine uterine endometrial and hepatic gene expression of the insulin-like growth factor system. *Theriogenology* 75(Suppl. 3): 500-512.
- Cowley D.E., Pomp D., William R.A., Eugene J.E. y Hawkins-Broun D. (1989). The impact of maternal uterine genotype on postnatal growth and adult body size in mice. *Genetics* 122: 193- 203.
- Cox S.F., McMillan W.H. y Donnison M.J. (1998). Establishment of a herd of cattle with divergent potential pregnancy rate. *Theriogenology*. 49 (1): 242.

- Dharmaraj N., Wang P. y Carson D.D. (2010). Cytokine and Progesterone Receptor Interplay in the Regulation of MUC1 Gene Expression. *Mol Endocrinol* 24: 2253-2266.
- Davis I.F., Kerton D.J., Parr R.A., White M.B. y Williams A.H. (1986). Hormone supplementation to increase fertility after uterine artificial insemination in ewes. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 16: 171-173.
- de Brun V., Carriquiry M., Meikle A., Forcada F., Casal A., Sosa C., Sequeira M. y Abecia J.A. (2015). Periconceptional undernutrition modifies endocrine profiles and hepatic gene expression in sheep. *J Anim Physiol Anim Nutr* 99 (Suppl. 4): 710-718.
- Farin C.E., Imakawa K. y Roberts R.M. (1989). In situ localization of mRNA for the interferon, ovine trophoblast protein-1, during early embryonic development of the sheep. *Molecular Endocrinology* : 1099–1107.
- Fenwick M.A., Fitzpatrick R., Kenny D.A., Diskin M.G., Patton J., Murphy J.J. y Wathes D.C. (2008). Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domest Anim Endocrinol.* 34: 31-44.
- Fermin L.M., Pain S.J., Blair H.T. y Kenyon P.R. (2014). BRIEF COMMUNICATION: Comparison of early embryo development in Cheviot and Suffolk breeds of sheep. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 74: 95-101.
- Fontana V.A. (2008). Citoquinas: el lenguaje del diálogo materno-embriionario. *QuimicaViva* 2:7: 80-102.
- Forde N., Simintiras E.A., Sturmev R., Momo S., Kelly A.K., Spencer T.E., Bazer F.W. y Lonergan P. (2014). Amino acids in the uterine luminal fluid reflects the temporal changes in transporter expression in the endometrium and conceptus during early pregnancy in cattle. *PLoS One* 9 (Suppl. 6): e100010.

- Gadd T.S., Osgerby J.C. y Wathes D.C. (2000). Regulation and localization of insulin-like growth factor binding protein-5 gene expression in the uterus and placenta of the cyclic and early pregnant ewe. *Biol Reprod* 62(Suppl. 5): 1415-1421.
- Gardner D.S., Buttry P.J., Daniel Z. y Symond M.E. (2007). Factors affecting birth weight in sheep; maternal environment. *Reproduction* 133: 297-307.
- Geisert R.D., Lee D.Y., Simmen F.A., Zavy M.T., Fliss A.E., Bazer F.W. y Simmen R.C. (1991). Expression of messenger RNAs encoding insulin-like growth factor-I, -II, and insulin-like growth factor binding protein-2 in bovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 45: 975–983.
- Giussani D.A., Forehead A.J., Gardner D.S. y Fletcher A.J. (2002). Postnatal cardiovascular function after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. *Journal of Physiology* 547: 67-76.
- Godkin J.D., Bazer F.W., Moffatt J., Sessions F. y Roberts R.M. (1982). Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocyst at day 13-21- *J Reprod Fertil* 65: 141-150.
- Goff A.K. (2002). Embryonic signals and survival. *Reprod Domest Anim* 37: 133-139.
- Gootwine E., Spencer T.E. y Bazer F.W. (2007). Litter-size-dependent intrauterine growth restriction in sheep. *Animal* 1: 547-564.
- Guillomot M., Flechon J.E. y Wintenberger – Torres S. (1981). Conceptus attachment in the ewe: an ultrastructural study. *Placenta* 2: 169-182.
- Guillomot M., Flechon J.E. y Leroy F. (1993). Blastocyst development and implantation. *Reproduction in Mammals and Man* 387-411. Eds. C Thibault, MC Levasseur & RHF Hunter. Paris: Ellipses.

- Hamilton G. y Kennedy T.G. (1994). Uterine vascular changes after unilateral intrauterine infusion of indomethacin and prostaglandin E2 to rats sensitized for the decidual cell reaction. *Biol Reprod* 50: 757-764.
- Harvey M. B., Leco K.J., Arcellana-Panlilio M.Y., Zhang X., Edward D.R. y Schultz G.A. (1995). Role of growth factors during peri-implantation. *Mol Hum Reprod* 10: 712-718.
- Hess A.P, Hamilton A.E, Talbi S., Dosiou C., Nyegaard M., Nayak N., Genbeccev-Krtolica O., Mavrogianis P., Ferrer K., Krussel J., Fisher S.J. y Giudice L.C. (2007). Decidual Stromal Cell Response to Paracrine Signals from the Trophoblast: Amplification of Immune and Angiogenic Modulators. *Biology of Reproduction* 76: 102-117.
- Irving L. M., Aye H., Theresa L., Powell. y Jansson T. (2013). Review: Adiponectin – The Missing Link between Maternal Adiposity, Placental Transport and Fetal Growth?. doi:10.1016/j.placenta.2012.11.024.
- Jenkinson C. M. C., Blair H.T., Kenyon P.R, Harding J.E., Bloomfield F.H., Breier B.H. y Gluckman P.D. (2007). Maternal constraints in sheep breeds with diverse birth weight. *New Zealand Society of Animal Production Proceedings* 67: 187-191.
- Johnson G.A., Bazer F.W., Jaeger L.A., Ka H., Garlow J.E., Pfarrer C., Spencer TE. y Burghardt R.C. (2001). Muc-1, integrin, and osteopontina expression during the implantation cascade in sheep. *Biology of Reproduction* 65: 820-828.
- Kao L.C., Tulac S., Lobo S., Imani B., Yang J. P., Germeyer A., Osteen K., Taylor R.N., Lessey B.A. y Giudice L.C (2002). Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 143:2119–2138.
- Kennedy T.G. (1980). Prostaglandins and the endometrial vascular permeability changes preceding blastocyst implantation and decidualization. *Prog Reprod Biol* 7: 234–243.

- Kim S., Choi Y., Spencer T.E. y Bazer F.W. (2003). Effect of the estrous cycle, pregnancy and interferon tau on expression of cyclooxygenase two (COX-2) in ovine endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1:58.
- Kim S., Marquard K., Stephens S., Loudon E., Allsworth J. y Moley K.H. (2011). Adiponectin and adiponectin receptors in the mouse preimplantation embryo and uterus. *Hum Reprod* 26: 82-95.
- Kirby C.J., Thatcher W.W., Collier R.J., Simmen F.A. y Lucy M.C. (1996). Effects of growth hormone and pregnancy on expression of growth hormone receptor, insulin like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding protein-2 and -3 genes in bovine uterus, ovary, and oviduct. *Biol Rep* 55: 996- 1002.
- Lai M.D., Lee L.R., Cheng K.S. y Wing L.Y. (2000). Expression of proliferating cell nuclear antigen in luminal epithelium during the growth and regression of rat uterus. *J Endocrinol* 166: 87–93.
- Liu H.C., Mele C, Catz D., Noyes N. y Rosenwaks Z. (1995). Production of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) by human endometrial stromal cell is stimulated by the presence of embryos. *J Assist Reprod Genet* 12(Suppl. 2): 78-87.
- Lonergan P. y Forde N. (2015). The role of progesterone in maternal recognition of pregnancy in domestical ruminants. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 216: 87-104.
- Lozano J.M., Abecia J.A., Forcada F., Zarazaga L. y Alfaro B. (1998). Effect of undernutrition on the distribution of progesterone in the uterus of ewes during the luteal phase of the estrous cycle. *Theriogenology*, 49: 539-546.
- Mann G.E. y Lamming G.E. (2001). Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121:175–180.

- Martal J., Chene N., Camous S., Huynh L., Lantier F., Hermier P., L'haridon R., Charpingy G., Charlier M. y 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: 355-380.
- Martin J.R., Lieber S.B., McGrath J., Shanabrugh M., Horvath T.L. y Taylor H.S. (2011). Maternal Ghrelin Deficiency Compromises Reproduction in Female Progeny through Altered Uterine Developmental Programming. *Endocrinology* 152 (Suppl. 5): 2060-2066.
- McCarthy S.D., Roche J.F. y Forde N. (2011). Temporal changes in endometrial gene expression and protein localization of members of the IGF family in cattle: effects of progesterone and pregnancy. *Physiol Genomics* 44: 130–140.
- Meikle A., Bielli A., Masironi B., Pedrana G., Wang H., Forsberg M. y Sahlin L. (2000). An immunohistochemical study on the regulation of estrogen receptor alpha by estradiol in the endometrium of the immature ewe. *Reprod. Nutr. Dev.* 40(6): 587-596.
- Mirkin S., Arslan M., Churikov D., Corica A., Diaz J.I., Williams S., Bocca S. y Oehninger S. (2005). In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod.* 20: 2104–2117.
- Moor R.M. y Rowson L.E. (1966). Local maintenance of the corpus luteum in sheep with embryos transferred to various isolated portions of the uterus. *J Reprod Fertil* 12: 539-550.
- Paunesku T., Mittal S., Protic M., Oryhon J., Korolev S.V., Joachimiak A. y Woloschak G.E. (2001). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int. J Radiat Biol* 10: 1007-1021.
- Parr R.A., Davis I.F., Fairclough R.J y Miles M.A. (1987). Overfeeding during early pregnancy reduce peripheral progesterone concentration and pregnancy rate in sheep. *J. Reprod. Fert.* 80: 317-320.

- Peña M., Góngora A. y Estrada J. (2007). Factores de crecimiento en el desarrollo folicular, embrionario temprano e implantación. Implicaciones en la producción de embriones bovinos. *Revista MVZ Córdoba* 12: 942-954.
- Pflaffl M.W. (2009). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
- Raddatz JR, Elias AN, Whisnant CS. Measurements of Adiponectin in lactating dairy cows. *J Anim Sci.* 2008; 86(E-Suppl.2):60.
- Reynolds T. S., Stevenson K.R. y Wathes D.C. (1997). Pregnancy-specific alterations in the expression of the insulin-like growth factor system during early placental development in the ewe. *Endocrinol* 138: 886-897.
- Rhind S.M., Leslie I.D., Gunn R.G. y Doney J.M. (1985). Plasma FSH, LH, prolactin and progesterone profiles of cheviot ewes with different levels of intake before and after mating, and associated effects on reproductive-performance. *Anim Reprod Sci* 8: 301–313.
- Riesewijk A., Martin J., van Os R., Horcajadas J. A., Polman J., Pellicer A., Mosselman S. y Simon C. (2003). Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH₂ versus LH₇ by microarray technology. *Mol Hum Reprod.* 9:253–264.
- Roberts R. M., Cross J.C. y Leaman D.W. (1992). Interferons as hormones of pregnancy. *Endocr Rev* 13: 432-452.
- Robinson R.S., Fray M.D., Wathes D.C., Lamming G.E. y Mann G.E. (2006). In vivo expression of interferon tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations of interferon tau protein during early pregnancy in the cow. *Mol Reprod Dev* 73(Suppl. 4):470-474.
- Rieger D., Loskutoff N.M. y Betteridge K.J. (1992). Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle

embryos produced and co-cultured in vitro. *J Reprod Fertil* 95(2):585-595.

Saremi B., Winand S., Friedrichs P., Kinoshita A., Rehage J., Dänicke S., Häussler S., Breves G., Mielenz M. y Sauerwein H. (2014). Longitudinal profiling of the tissue-specific expression of genes related with insulin sensitivity in dairy cows during lactation focusing on different fat depots. *PLoS One* 21;9(1):e86211.

Satterfield M.C., Bazer F.W. y Spencer T.E. (2006). Progesterone Regulation of Preimplantation Conceptus Growth and Galectin 15 (LGALS15) in the Ovine Uterus. *Biology of Reproduction* 75(2): 289-296.

Satterfield M.C., Gao H., LI X., Wu G., Johnson G.A., Spencer T.E. y Bazer F.W. (2010). Select nutrients and their associated transporters are increased in the ovine uterus following early progesterone administration. *Biol. Reprod.* 82: 224–231.

Sharma R.K., Parkinson T.J., Kenyon P.R., Jenkinson C.M.C. y Blair H.T. (2013). Uterine environment and early embryonic development in sheep. *Small Ruminant Research* 115 (Suppl. 1): 67-70.

Sheldrick E.L. y Flint A.P.F. (1983). Luteal concentrations of oxytocin decline during early pregnancy in the ewe. *J Reprod Fert* 68: 477-480.

Smidka K. y Maresová D. (2015). Adipose tissue as an endocrine organ: An update on pro- inflammatory and anti-inflammatory microenvironment. *Prague Medical Report.* 116 (2): 87-111.

Simmen R.C., Michel F.J., Fliss A.E. y Fliss M.F. (1992). Ontogeny, immunocytochemical localization, and biochemical properties of the pregnancy-associated uterine elastase/cathepsin-G protease inhibitor, antileukoproteinase (ALP): monospecific antibodies to a synthetic peptide recognize native ALP. *Endocrinology* 130(Suppl. 4): 1957-1965.

- Smith J.F., Farquhar P.A. y Welch R.A.S. (1985). Failure of progesterone administered mid-cycle to influence conception rate or embryonic mortality. *Proc. Endocr. Soc. Aust. Suppl.* 28, 9, Abstr.
- Sosa C., Lozano J., Viñoles C., Acuña S., Abecia J., Forcada F., Forsberg M. y Meikle A. (2004). Effect of plane of nutrition on endometrial sex steroid receptor expression in ewes. *Anim Reprod Sci* 84: 337-348.
- Sosa C., Abecia J.A., Forcada F., Viñoles C., Tasende J.A., Valares J.A., Palacín I., Martín G.B. y Meikle A. (2006). Effect of undernutrition on uterine progesterone and estrogen receptors and on endocrine profiles during the ovine oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev* 18: 447-458.
- Sosa C., Abecia J.A., Carriquiry M., Forcada F., Martín G.B., Palacín I. y Meikle A. (2009). Early pregnancy alters the metabolic responses to restricted nutrition in sheep. *Domest Anim Endocrinol.* 36: 13-23.
- Spencer T.E. y Bazer W.T. (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: 1527-43.
- Spencer T.E., Gray A., Johnson G.A., Taylor K.M., Gertler A., Gootwine E., Ott T.L. y Bazer F.W. (1999). Effects of recombinant ovine interferon tau, placental lactógeno, and growth hormone on the ovine uterus. *Biology of Reproduction* 61: 1409-1418.
- Spencer T.E., Johnson G.A., Burghardt R.C. y Bazer F.W. (2004a). Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biology of Reproduction* 71: 2-10.
- Spencer T.E., Johnson G.A., Bazer F.W. y Burghardt R.C. (2004b). Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction* 128: 657-668.
- Spicer L.J., Hanrahan J.P., Zavy M.T. y 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. *Journal of Reproduction and Fertility*. 97: 403-409.

Spicer L.J. y Echtenkamp S.E. (1995). The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Dom. Anim. Endocrinol.* 12: 223.

Stevenson, K. R. 1994. Investigation of the insulin-like growth factor (IGF) system in the ovine uterus and oviduct. Ph.D. Diss., Univ. Cambridge, Cambridge, United Kingdom.

Takemura Y., Osuga Y., Yamauchi T., Kobayashi M., Harada M., Hirata T., Morimoto C., Hirota Y., Yoshino y Koga K. (2006). Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. *Endocrinology*. 147: 3203-3210.

Thatcher W.W., Guzeloglu A., Meikle A., Kamimura S., Bilby T., Kowalski A.A., Badinga L., Pershing R., Bartolome J. y Santos J.E.P. (2003). Regulation of embryo survival in cattle. *Reproduction Supplement* 61: 253–266.

Tomic D., Frech M.S., Babus J.K., Symonds D., Furth P.A., Koos R.D. y Flaws J.D. (2007). Effect of ER α overexpression on female reproduction in mice. *Reprod Toxicol* 23: 317–325.

Walton A. y J. Hammond. (1938). The maternal effects on growth and conformation in shire horse – Shetland pony crosses. *Proceedings of the Royal Society* 125: 311-335.

Wathes D.C, Reynolds T.S., Robinson R.S. y Stevenson K.R. (1998). Role of the insulin-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. *J Dairy Sci* 81: 1778-1789.

Watson A.J., Westhusin M.E. y Winger Q.A. (1999). IGF paracrine and autocrine interactions between conceptus and oviduct. *J Reprod Fertil Suppl* 54: 303-315.

Wen-ge M., Haengseok S., Sanjoy K., Bibhash C.P. y Sudhansu K.D. (2003). Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the

window of uterine receptivity for implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100(5): 2963–2968.

Wilmot I. y Sales D.I. (1981). Effect of an asynchronous environment in embryonic development in sheep. *Journal of Reproduction and fertility* 61: 179-184.

Wilsher S., y Allen W.R. (2002). The influences of maternal size, age and parity on placental and fetal development in the horse. *Theriogenology* 58: 833–835.

Wintenberger-Torres S. y Flechon J.E. (1974). Ultrastructural evolution of the trophoblast cells of the pre-implantation sheep blastocyst from day 8 to day 18. *Journal of Anatomy* 118: 143-153.

Wu S.H., Weber W.J., Chester-Jones H., Hansen L.B. y Crooker B.A. (2004). Effects of intake, selection for milk yield, and bST administration on hepatic expression of insulin receptors and components of the somatotrophic axis in growing Holstein heifers. *J Dairy Sci.* 87(S1): 364. Abstract W205.

10. ANEXOS

- I. Gestation related gene expression and protein localization in endometrial tissue of Suffolk and Cheviot ewes at gestation day 19, following transfer of Suffolk or Cheviot embryos.
- II. Endocrine profiles during early gestation in Suffolk and Cheviot dams