

Análisis de la expresión transcripcional del receptor de estrógeno en ovario de ovejas prepúberes de razas Texel y Criolla Araucana mediante RT-PCR cuantitativo en tiempo real[#]

Transcriptional expression analysis of oestrogen receptor in ovary of Texel and Araucana sheep breeds by real time quantitative RT-PCR.

M Flores^a, A Vasconcellos^b, M Paredes^{a*}

^aLINBA, Laboratorio de Investigación en Biotecnología Animal, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

^bCEBIOR, Centro Biotecnológico de la Reproducción, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

SUMMARY

The morphofunctional state of sheep reproductive system of sheep is determined by sex hormones, which act through specific receptors triggering a series of cellular, metabolic and proliferative dependent expression of numerous genes. Unlike other mammals, in sheep endometrium and possibly other reproductive organs the oestrogen receptors are physiologically active from the prepubertal stage, with a function not yet understood. Information on the expression of sex hormone receptors in the reproductive system is very poor, particularly in the ovary and there are no studies that correlate breed with the expression of these receptors. Generally, breeders privilege higher level of prolificacy breed and this could be related to the level of oestrogen receptors expression in the reproductive system. The aim of this study was to evaluate the transcriptional expression of the oestrogen receptor in the ovary of Texel high prolificacy and Criolla Araucana standard prolificacy prepubertal sheep bred by RT-PCR quantitative real time analysis.

Key words: oestrogen receptor, Texel, Criolla Araucana, real time quantitative RT-PCR.

RESUMEN

El estado morfofuncional del sistema reproductivo de las ovejas es determinado por las hormonas sexuales, que actúan por medio de receptores específicos, desencadenando una serie de cambios celulares, metabólicos y proliferativos dependientes de la expresión de numerosos genes. A diferencia de otros mamíferos, las ovejas presentan en el endometrio y posiblemente otros órganos del sistema reproductivo receptores de estrógenos fisiológicamente activos desde la etapa prepúberal cuya función aún no está esclarecida. La información sobre la expresión de receptores de hormonas sexuales en el aparato reproductor es muy escasa, sobre todo en el ovario y no existen estudios que correlacionen la raza con la expresión de estos receptores. Generalmente los criadores privilegian razas de mayor nivel de prolificidad y esto podría estar relacionado con el nivel de expresión de los receptores de estrógeno en el sistema reproductivo. El objetivo del presente trabajo fue evaluar comparativamente la expresión transcripcional del receptor de estrógeno en el ovario de ovejas prepúberes de raza Texel de alta prolificidad y de raza Criolla Araucana de prolificidad estándar, mediante análisis de RT-PCR en tiempo real cuantitativo.

Palabras clave: receptor de estrógeno, Texel, Criolla Araucana, RT-PCR cuantitativo en tiempo real.

INTRODUCCIÓN

La reproducción en ovejas, así como en otros mamíferos, está regulada por diversas hormonas sexuales que ejercen sus efectos mediante su unión a proteínas receptoras específicas, las que modulan respuestas celulares relacionadas con el desarrollo morfofuncional del tracto genital (Ing y Ott 1999, Meikle y col 2000, Vasconcellos y col 2005). Una de las hormonas que ejerce efectos relevantes para la función reproductiva es el estrógeno, el que es responsable de la diferenciación sexual, desarrollo, crecimiento y comportamiento reproductivo (Vasconcellos

y col 2011). El efecto sistémico del estrógeno requiere necesariamente la presencia de receptores intracelulares en las células dianas, donde la formación del complejo hormona-receptor genera la activación de numerosos genes cuyos productos de expresión finalmente producen efectos morfofuncionales como los anteriormente descritos (Evans 1988, Ing y Tornesi 1997). De este modo, el nivel de expresión celular y distribución histológica de las proteínas receptoras determinan esencialmente el efecto de la acción hormonal de los estrógenos (Vasconcellos y col 2009, Vasconcellos y col 2011). En mamíferos se han descrito dos subtipos de receptores de estrógeno, denominados alfa y beta respectivamente (RE- α y RE- β), siendo RE- α , más predominante en cuanto a su expresión a nivel endometrial (Meikle y col 2000). Estos receptores se han detectado en este tejido en algunas especies de mamíferos durante la etapa prepúberal (Meikle y col 2000) sin que a la fecha se

Aceptado: 16.10.2014.

[#] Financiado por el Proyecto DIUFRO 12-0027.

* 45-592832, Casilla 54-D, Temuco, Chile; mparedes@ufro.cl

comprenda cual es el papel funcional de dicha expresión en hembras prepúberes. Factores genéticos como la raza podrían estar relacionados con el nivel de expresión de estos receptores (Vasconcellos y col 2009, 2011, 2012). Por ejemplo, las ovejas de raza Texel a diferencia de la raza Criolla Araucana tienen mayores índices de prolificidad, presentando un alto porcentaje de gestación múltiple, lo que podría tener relación con una mayor expresión de receptores estrogénicos en el sistema reproductivo. No existen estudios en los cuales se hayan analizado los niveles de expresión diferencial de RE- α entre distintas razas de ovejas. De este modo, el propósito de este trabajo fue evaluar comparativamente el nivel transcripcional de los RE- α en ovario de ovejas de prolificidad estándar (Criolla Araucana) y de alta prolificidad (Texel).

MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES UTILIZADOS Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

La investigación se realizó con muestras de tejido ovárico obtenidas de tres ovejas de raza Criolla Araucana y tres ovejas de raza Texel, todas hembras prepúberes de cuatro meses de edad. Los animales fueron mantenidos con alimentación estándar y fotoperiodo natural en el Campo Experimental Maquehue de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. Antes de la extracción de las muestras biológicas, los animales fueron sacrificados por administración de pentobarbital sódico (100 a 200 mg/kg) vía intravenosa (Bolant y col 1990, Andrews y col 1993, Gnanalingham y col 2005), de acuerdo con el consentimiento del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Frontera. Para el estudio se realizó la extracción del sistema reproductor obteniendo ambos ovarios, los que fueron depositados temporalmente en nitrógeno líquido y posteriormente almacenado a -80°C en el laboratorio para evitar la degradación del material genético.

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE RE-A POR RT-PCR EN TIEMPO REAL

Obtención de partidores para la amplificación de RE. Los partidores utilizados para el análisis de expresión transcripcional del RE- α se derivaron a partir de la secuencia del cDNA del receptor de *Ovis aries* disponible en la base de datos *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (cuadro 1). El diseño bioinformático de los partidores se efectuó utilizando el programa Primer3 disponible en <http://primer3.sourceforge.net/>. Los partidores utilizados para amplificar el cDNA de β -actina son los descritos por Dzidic y col 2004 (cuadro 1).

Extracción de ARN total. La extracción de ARN total se realizó a partir de 0,5 g de tejido ovárico de ambas razas, mediante el uso del Kit "AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit" (Axygen Biosciences, USA). Para

estimar la concentración del ARN obtenido se utilizó la ecuación $[\text{ARN}] = \text{OD}260 \times \text{FD} \times 40 \mu\text{g/ml}$, donde FD es el factor de dilución utilizado y OD260 la absorbancia medida a 260 nm (Sambrook y col 1989). La pureza se evaluó mediante la razón de absorbancia OD260/OD280, considerado valores de 1,75 a 1,95 como buena estimación de pureza (Sambrook y col 1989).

Preparación de ADN complementario (ADNc). El ARN obtenido se utilizó para preparar ADNc mediante el uso del kit "High Capacity RNA to cDNA Kit" (Applied Biosystems, USA). Para ello, se utilizaron 2 μg de ARN total, el cual se mezcló con 10 μl de buffer RT 2X y 1 μl de enzimas 20X (transcriptasa reversa y RNAsa H), completando con agua para un volumen final de reacción de 20 μl . Luego se incubó a 37°C por 60 minutos, finalizando la reacción de transcripción calentando a 75°C por 5 minutos. Posteriormente el ADNc fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

El ADNc utilizado para la obtención de la curva estándar se preparó a partir de 0,2 μg de ARN mensajero del gen "housekeeping" gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), mediante el uso del kit "High Capacity RNA to cDNA Kit" (Applied Biosystems, USA). Para ello se utilizaron 4 μl del ARN mensajero a 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, el que se mezcló con 10 μl de buffer RT 2X y 6 μl de agua ultrapura para un volumen final de reacción de 20 μl . Luego se incubó 37°C por 60 minutos, finalizando la reacción de transcripción calentando a 75°C por 5 minutos. El ADNc se utilizó posteriormente para la preparación de una curva estándar.

Cuantificación relativa mediante el método $\Delta\Delta\text{Ct}$. El nivel de expresión relativo del transcrito de RE- α se evaluó por medio de RT-PCR en tiempo real mediante el método "Comparative Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$)" descrito en el cuadro 2 (Livak y Schmittgen 2001, Matamala y col 2010) e implementado en el sistema de amplificación en tiempo real "Step One" de Applied Biosystem (USA).

El ADNc preparado a partir de ARN total extraído de ovario se utilizó como templado para la amplificación específica del RE- α y de β -actina cuya expresión constitutiva se utilizó como gen normalizante. Ambos genes se amplificaron mezclando 1 μl del respectivo ADNc con 6 μl de buffer de reacción 2X incluido en el kit "Maxima SYBR Green Master Mix 2X Rox" (Thermo Scientific, USA), 3 μl de agua ultrapura, 1 μl de cada partidore (ESRA-F y ESRA-R; cuadro 1) para completar un volumen de reacción final de 12 μl . El ADNc de β -actina se amplificó con mezclas de reacciones similares a las descritas para RE- α , pero utilizando los partidores específicos OB-A y OB-S (cuadro 1). Las condiciones térmicas de amplificación para RE- α y β -actina fueron similares, programándose con un ciclo inicial de 10 minutos a 95°C , seguido por 40 ciclos compuestos cada uno, por desnaturalización a 95°C por 35 segundos, hibridación a 60°C por 35 segundos y extensión a 72°C por 35 segundos. Al término de los 40 ciclos de amplificación se programó un ciclo para

Cuadro 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados como partidores para las reacciones de amplificación del ADNc del receptor de estrógeno alfa (ESRA-F/ESRA-R), β -actina (OB-S/OB-A) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH -F y GAPDH-R).

Oligonucleotides sequences used as primer for cDNA amplification reactions of the oestrogen receptor (ESRA-F/ESRA-R), β -actin (OB-S/OB-A) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH -F y GAPDH-R).

Nombre	Secuencia	Fuente / Acceso a Genbank
ESRA-F	AGGATTCACCTAGCGCTTCA	AY_033393
ESRA-R	CAGCCATGCAACAGAGAAAA	AY_033393
OB-S:	AACTCCATCATGAAGTGTGAC	Dzidic y col 2004
OB-A:	GATCCACATCTGCTGGAAGG	Dzidic y col 2004
GAPDH-F:	CAAGGTCATCCATGACAACCTTG	NM_001190390.1
GAPDH-R	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG	NM_001190390.1

Cuadro 2. Método de cuantificación utilizado para evaluar el nivel de expresión relativa del transcrito del RE- α en tejido ovárico de ovejas de razas Texel y Criolla Araucana. El nivel de expresión en Texel mediante el método $\Delta\Delta Ct$ se determinó respecto de la muestra de referencia utilizada (Criolla Araucana). La expresión transcripcional de β -actina se utilizó como gen normalizador de la expresión de RE- α .

Quantification method used to assess the relative level of expression of ER- α transcribed in ovarian tissue of Texel and Criolla Araucana race. The relative quantification method $\Delta\Delta Ct$ was determined according to reference sample expression (Criolla Araucana). The transcriptional expression of β -actin was used as normalising gene of the ER- α expression.

Normalización:

Ct RE Araucana – Ct β act. Araucana = $\Delta Ct1$

Ct RE Texel – Ct β act. Texel = $\Delta Ct1$

Unidades de expresión relativa:

$\Delta Ct1 - \Delta\Delta Ct2 = \Delta\Delta Ct$

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ = unidades de expresión relativa

el análisis de fusión de los amplicones, lo que permitió evaluar la especificidad de la reacción y descartar de este modo el efecto de productos no específicos sobre la cuantificación. Las condiciones térmicas para este análisis fueron de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por un minuto y 95 °C por 15 segundos.

Cuantificación absoluta utilizando una curva estándar. El nivel de expresión absoluta del transcrito del RE- α se evaluó mediante el método “Quantitation - Standard Curve” (Rutledge 2003) utilizando el sistema de amplificación en Tiempo Real “Step One” de Applied Biosystem (USA). Para ello se preparó una curva estándar a partir de la amplificación del ADNc de GAPDH preparado a partir del ARNm tal como se describió anteriormente. Para ello se utilizaron diluciones seriadas de concentraciones conocidas (200, 20, 2, 0,2, 0,02 y 0,002 ng/ μ l). De cada una de estas diluciones se utilizó 1 μ l en un volumen final de reacción de 20 μ l, diluyéndose finalmente a concentraciones de 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 y 0,0001 ng/ μ l en la mezcla de reacción. La reacción de PCR se preparó mezclando 1 μ l de ADNc, 10 μ l de buffer de reacción 2x incluido en el

kit “Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2X Rox” (Fermentas, USA), 8 μ l de agua ultrapura y 0,5 μ l de cada partidor (GAPDH-F y GAPDH-R; cuadro 1), para completar un volumen de reacción final de 20 μ l. Las condiciones térmicas de amplificación se programaron con un ciclo inicial de 10 minutos a 95 °C, seguido por 40 ciclos compuestos por una desnaturalización a 95 °C por 20 segundos, hibridación a 60 °C por 25 segundos y extensión a 72 °C por 35 segundos. Se programó el término de los 40 ciclos de amplificación, un ciclo para el análisis de fusión de los amplicones, lo que permitió evaluar la especificidad y descartar de este modo el efecto de productos no específicos sobre la cuantificación. Las condiciones térmicas del análisis fueron de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por un minuto y 95 °C por 15 segundos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significancia estadística de las diferencias de los valores de expresión transcripcional de RE- α entre ovarios de ovejas Criolla Araucana y Texel se evaluó mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (Mann y Whitney 1947), considerando un nivel de significancia del 95% ($P < 0,05$). Se utilizó el programa GraphPad Prism 5.0 para Windows (GraphPad Software Inc, USA).

RESULTADOS

La diferencia en el nivel de expresión relativa del transcrito del RE- α entre ovarios de ovejas prepúberes de razas Texel y Araucana fue cuantificado primariamente mediante el método “Comparative Ct” ($\Delta\Delta Ct$) según Livak y Schmittgen (2001) cuyos resultados se muestran en las figuras 1 y 3a. La primera muestra las curvas de amplificación obtenidas por RT-PCR en tiempo real de los transcritos del RE- α (figura 1a) y β -actina (figura 1b) expresados en ovarios de ovejas prepúberes de razas Texel y Araucana. Los valores de Ct (Ciclo threshold), definido por el punto donde la línea “threshold” (LT) corta las curvas de amplificación, varían entre los ciclos 21 y 24 para RE- α y alrededor del ciclo 18 para β -actina (control endógeno), demostrando constancia en la expresión del

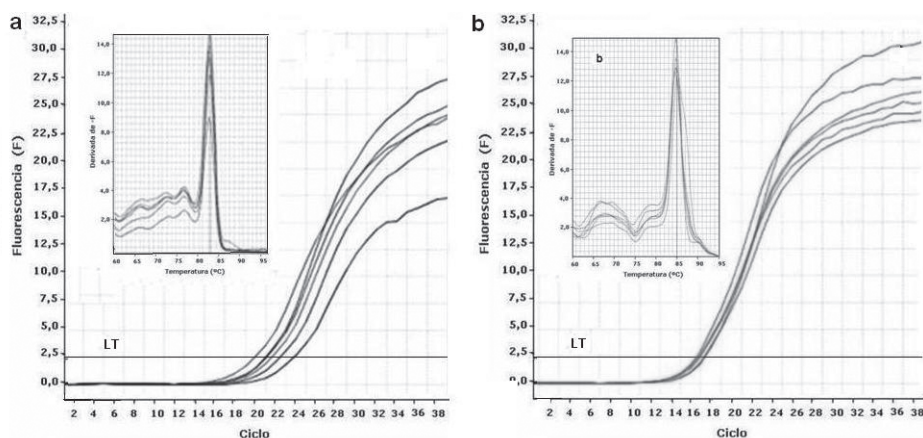


Figura 1. Curvas de amplificación y de fusión (recuadro interior) de los amplicones del receptor de estrógeno (a) y β -actina (b) en ovejas de razas Texel y Criolla Araucana. Se indica sobre la base de las curvas de amplificación la línea “threshold” (LT).

Amplification and melting curves (figure inside) of the oestrogen receptor amplicons (a) and β -actin amplicons (b) Texel and Criolla Araucana sheeps. The line “threshold” (LT) is indicated on the basis of the amplification curves.

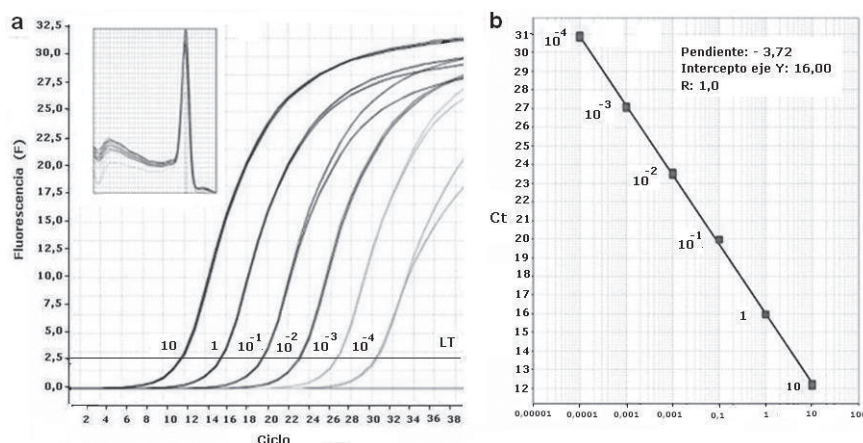


Figura 2. a) Curva estándar obtenida según el resultado de amplificación por RT-PCR de GAPDH mostrado en el cuadro “b”. La curva estándar correlaciona el ciclo threshold (Ct) con la concentración inicial del templado (ADNc de GAPDH) y es utilizada para evaluar cuantitativamente, la expresión transcripcional de ER- α . b) Curvas de amplificación y de fusión (recuadro interior) de producto de RT-PCR de GAPDH generadas a partir de templados de concentración conocidas. Se muestra al costado de cada curva la concentración (ng/ml) de los templados utilizados como estándares. Se indica sobre la base de las curvas de amplificación la línea “threshold” (LT).

a) Standard curve obtained as the result of RT-PCR amplification of GAPDH shown in “b”. Standard curve correlating the threshold cycle (Ct) to the initial concentration of the GAPDH cDNA in the reaction mixture and is used to quantitatively assess the transcriptional expression of ER- α . b) amplification curves and melt (Inset) of RT-PCR product of GAPDH obtained from initial known template concentration. At the side of each curve is shown the concentration (ng/ml) of the templates used as standard. The line “threshold” (LT) is indicated on the basis of the amplification curves.

gen utilizado como normalizador. El recuadro interno en las figuras 1a y 1b muestran respectivamente curvas de análisis de temperaturas de fusión de ambos transcritos indicando la amplificación de un producto específico en ambas reacciones de PCR. Las curvas de fusión de los amplicones de RE- α y β -actina generaron temperaturas de fusión (T_m) de 81,5 °C y 85,0 °C respectivamente. De acuerdo con los valores de cuantificación relativa obtenidos, las ovejas Texel, de alta prolificidad, presentan un mayor nivel de expresión del RE- α en tejido ovárico en relación con las ovejas Araucana, de prolificidad estándar, presentando la raza Texel 2,35 veces más expresión (figura 3a).

La cuantificación absoluta se basó en el cálculo de la concentración del templado en las muestras interpolando los valores con una curva estándar preparada con concentraciones conocidas (Figura 2a). Las curvas de fusión de los amplicones GAPDH no muestran amplificaciones de productos inespecíficos y solo se destaca un producto específico con T_m de 86,4 °C. De acuerdo con los valores de la ecuación de la recta dados por la curva estándar, como son la pendiente (-3,72), el intercepto (16,00) y coeficiente de correlación (1) permitió extrapolar la concentración de templado en la muestra problema (figura 2b). Obteniendo una concentración promedio de 0,038 pg de

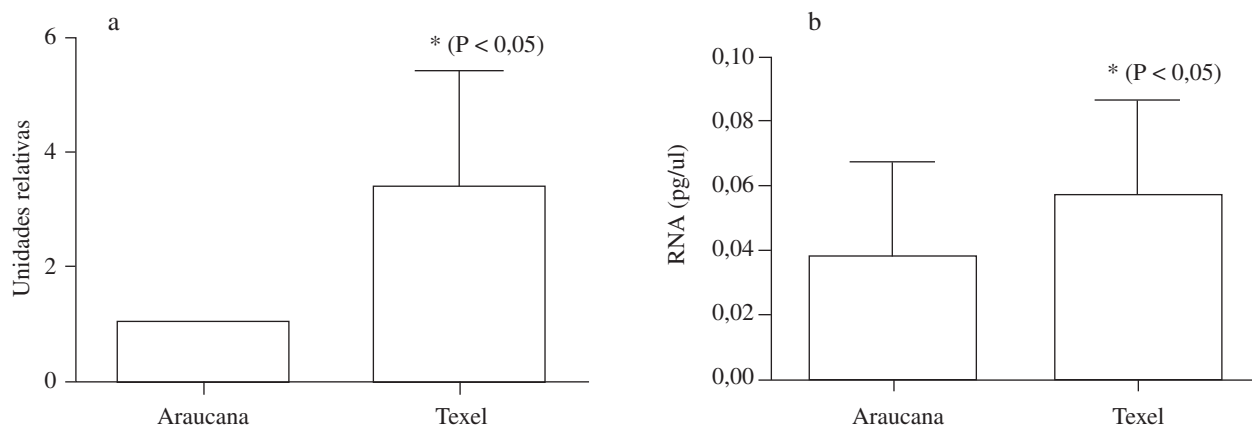


Figura 3. a) Análisis del nivel de expresión relativa del RE- α en ovarios de ovejas Texel y Criolla Araucana prepúberes, mediante el método “ $\Delta\Delta C_t$ comparativo”. Los valores de expresión se representan en el gráfico como unidades relativas (Número de veces) respecto de la muestra de referencia (Criolla Araucana), cuyo valor es 1. Se muestra el promedio obtenido para la expresión ovárica de RE- α en tres animales. b) Nivel de expresión del gen ER- α en ovarios de ovejas Texel y Criolla Araucana prepúberes, determinado por cuantificación absoluta utilizando una curva estándar (figura 3). El gráfico representa el promedio de tres medidas independientes ($P < 0,05$).

a) Relative expression analysis level of ER- α in Texel and Criolla Araucana ovaries, using “comparative $\Delta\Delta C_t$ method”. The expression values are represented in the graph as relative units (Fold change) compared to the reference sample (Criolla Araucana), whose value is 1. It shows the average obtained for the ovarian expression of ER- α in three animals. $P < 0,05$. b) Absolute quantitation analysis of ER- α gene in prepubertal Texel and Criolla Araucana ovaries regarding to a standard curve (figure 3). The graph represents the average of three independent measurements ($P < 0,05$).

ARN, en Araucana y de 0,056 pg en Texel, presentando una diferencia de concentración de 0,018 pg. El análisis estadístico reveló una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores de expresión de acuerdo con el método de cuantificación absoluta utilizado. Esto indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre el nivel de expresión transcripcional del RE- α entre ovarios de ovejas Araucana y Texel.

DISCUSIÓN

Los estrógenos son hormonas relevantes para el desarrollo y control de funciones reproductivas en mamíferos, y sus efectos son mediados a nivel celular por receptores específicos cuya expresión determina la distribución y efectividad del efecto hormonal (Rothschild y col 1996, Ihionkhan y col 2002). La presencia de RE- α se ha estudiado en el tracto genital de distintas especies y se ha demostrado diferencias entre ellas, mientras que en ovejas el RE- α se encuentra en altas concentraciones en el útero y oviductos de animales prepúberes (Garfolo y Tasende 1996, Meikle y col 1997, 2001, 2004), en perros estos receptores son indetectables en este estado del desarrollo (Lessey y col 1981, Vasconcellos y Pacheco 2006).

La evaluación del nivel de expresión del transcrito de RE- α en ovario de hembra prepúber mediante cuantificación relativa y absoluta indica un mayor nivel de expresión en ovejas de raza Texel respecto de la Criolla Araucana coincidiendo con el análisis de expresión de la proteína del RE- α mediante inmunohistoquímica en estas mismas razas realizados por Vasconcellos y col (2012). Esto confirma que

tanto a nivel del transcrito como de la proteína receptora existen diferencias significativas entre estas razas. También se ha detectado expresión de receptores de estrógeno fisiológicamente activos en endometrio de hembras prepúberes de otras razas ovinas (Meikle y col 2000, Vasconcellos y col 2010), sin embargo, aún no se comprende el significado funcional de la expresión temprana del RE- α en hembras prepúberes. Es posible sugerir que la presencia de receptores en el ovario prepúber en ovinos podría favorecer una respuesta modulada del desarrollo morfofuncional del sistema reproductivo ante las variaciones ambientales de fotoperíodo y condiciones de temperatura que esencialmente inducen la secreción de hormonas sexuales y el inicio de la actividad reproductiva en estos animales, de este modo la hembra prepúber podría disponer de capacidad de respuesta inmediata y efectiva frente al aumento de estrógenos inducido por factores ambientales favorables. Otra hipótesis relacionada no solo con la presencia de receptores de estrógenos, sino más bien con el nivel de expresión de estos, Vasconcellos y col (2012) plantean que la alta prolificidad de las ovejas de raza Texel podría estar relacionada con una mayor expresión de los RE- α en el sistema reproductivo, ya que la presencia de receptores de RE- α en animales adultos está asociada a mecanismos de diferenciación y proliferación celular que hacen posible la funcionalidad reproductiva tanto a nivel de prepúberes como adultos; sin embargo, el rol funcional de la expresión de estos receptores en hembras ovinas prepúberes debe ser motivo de mayor investigación, más aún considerando que otros mamíferos no expresan receptores durante la etapa prepuberal (Meikle y col 2004, Vasconcellos y col 2006).

Evidentemente la capacidad reproductiva de las ovejas no solo depende del nivel de expresión de este receptor, sino que de muchos otros en conjunción con sus respectivos ligandos hormonales, siendo necesarios estudios multifactoriales que permitan verificar esta hipótesis.

REFERENCIAS

- Andrews EJ, BT Bennett, J D Clark, KA Houpt, PJ Pascoe, GW Robinson, JR Boyce. 1993. Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J Am Vet Med Assoc* 202, 229-249.
- Bolant B, MA Calvo, D Cejalvo, LO Gimeno, L Gimeno, JM Lloris. 1990. La eutanasia en los animales de laboratorio. Centro de investigación. Hospital General Universitario de Valencia. *Research in Surgery*, suplemento 5.
- Dzidic A, M Kaps, RM Bruckmaier. 2004. Machine milking of Istrian dairy crossbreed ewes: Udder morphology and milking characteristics. *Small Rum Res* 55, 183-189.
- Evans RM. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
- Garfolo EG, C Tasende. 1996. Uterine estrogen and progesterone receptors in prepubertal ewe distribution in myometrium, endometrium, and caruncles. *Vet Res* 27, 177-183.
- Gnanalingham MG, A Mostyn, ME Symonds, T Stephenson. 2005. Ontogeny and nutritional programming of adiposity in sheep: potential role of glucocorticoid action and uncoupling protein-2. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289, 1407-1415.
- Ihionkhan CE, KL Chambliss, LL Gibson, LD Hahner, M E Mendelsohn, PW Shaul. 2002. Estrogen Causes Dynamic Alterations in Endothelial Estrogen Receptor Expression. *Circ Res* 91, 814 -820.
- Ing NH, MB Tornesi. 1997. Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biol Reprod* 56, 1205-1215.
- Ing NH, TL Ott. 1999. Estradiol up-regulates estrogen receptor- α messenger ribonucleic acid in sheep endometrium by increasing its stability. *Biol Reprod* 60, 134-139.
- Lessey BA, R Wahawisan, TA Gorell. 1981. Hormone regulation of cytoplasmic estrogen and progesterone receptors in the beagle uterus and oviduct. *Moll Cell Endocrinol* 21, 171-180.
- Livak KJ, TD Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Mann HB, DR Whitney. 1947. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Stat* 18, 50-60.
- Matamala F, M Paredes, R Cornejo. 2010. Efecto del láser de baja energía sobre la expresión de GAP-43 (growth associated protein 43) en nervio isquiático de rata. *Int J Morphol* 28, 815-821.
- Meikle A, C Tasende, M Rodríguez, EG Garófalo. 1997. Effects of estradiol and progesterone on the reproductive tract and on uterine sex steroid receptors in female lambs. *Theriogenology* 48, 1105-1113.
- Meikle A, A Bielli, B Masironi, G Pedrana, H Wang, M Forsberg, L Sahlin. 2000. An immunohistochemical study on the regulation of estrogen receptor α by estradiol in the endometrium of the immature ewe. *Reprod Nutr Dev* 40, 587-596.
- Meikle A, EG Garófalo, M Rodríguez-Piñón, C Tasende, L Shalin. 2001. Regulation by gonadal steroids of estrogen and progesterone receptors along the reproductive tract in female lambs. *Acta Vet Scand* 42, 161-169.
- Meikle A, C Tasende, C Sosa, EG Garófalo. 2004. The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. *Reprod Fertil Dev* 16, 385-394.
- Rothschild M, C Jacobson, D Vaske, C Tuggle, L Wang, T Short, G Eckardt, S Sasaki, A Vincent, D McLaren, O Southwood, H Van Der Steen, A Mileham, G Plastow. 1996. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Proc Natl Acad Sci* 93, 201-205.
- Rutledge RG, C Côté. 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res* 31, 93.
- Sambrook J, EF Fritsch, T Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA.
- Vasconcellos A, N Sepúlveda, J Castillo, C Rosas. 2005. Presencia de receptores de estrógenos y de progesterona en el endometrio de ovejas preñadas. Estudio Inmunocitoquímico. *Int J Morphol* 23, 393-396.
- Vasconcellos A, BN Sepúlveda, CC Pacheco. 2006. Presencia de receptores de estrógeno, progesterona y de CBG en el tracto genital de ovejas y de perras. Estudio inmunocitoquímico. *Int J Morphol* 24, 457-462.
- Vasconcellos A, M Paredes, E Barrientos, Y Olmazábal, D Nuñez, J Navarrete, B Molina. 2009. Análisis de la expresión del receptor del estrógeno en endometrio de ovejas alimentadas con dieta normal y dieta suplementada. *Int J Morphol* 27, 1093-1098.
- Vasconcellos A, M Paredes, D Nuñez, E Barrientos, Y Olmazábal, J Navarrete. 2010. Study of the Expression of Progesterone Receptors in the Endometrium of Ewes with Normal and Supplementary Diet. *Int J Morphol* 28, 575-578.
- Vasconcellos A, M Paredes, C Hernández, D Muñoz, J Navarrete. 2011. Expresión de receptores de estrógenos y progesterona en el tracto genital de ovejas raza Texel. *Int J Morphol* 29, 1268-1273.
- Vasconcellos A, M Paredes. 2012. Detección inmunohistoquímica del receptor de estrógeno en el endometrio de ovejas de alta prolificidad y de prolificidad estándar. *Int J Morphol* 30, 1090-1093.