

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

**Análisis de la expresión transcripcional del receptor de estrógeno en ovario de ovejas de razas  
Texel y Criolla Araucana mediante RT-PCR cuantitativo en Tiempo Real #**

Transcriptional Expression Analysis of Estrogen Receptor in Ovary of Texel and Araucana sheeps breeds by Real time  
quantitative RT-PCR.

M Flores<sup>a</sup>, A Vasconcellos<sup>b</sup>, M Paredes<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>LINBA, Laboratorio de Investigación en Biotecnología Animal, Universidad de La Frontera, Temuco,  
Chile.

<sup>b</sup>CEBIOR, Centro Biotecnológico de la Reproducción, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

# Financiado por el Proyecto DIUFRO 12-0027.

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

## 26 SUMMARY

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

38

39 Key words: estrogen receptor, Texel, Criolla Araucana, Real time quantitative RT-PCR.

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

## 51 INTRODUCCIÓN

52 La reproducción en ovejas como en otros mamíferos, está regulada por diversas hormonas  
53 sexuales que ejercen sus efectos mediante su unión a proteínas receptoras específicas, las cuales  
54 modulan respuestas celulares relacionadas con el desarrollo morfo-funcional del tracto genital  
55 (Vasconcellos y col 2005, Ing y Ott 1999, Meikle y col 2000). Una de las hormonas que ejerce efectos  
56 relevantes para la función reproductiva, es el estrógeno, el cual es responsable de la diferenciación  
57 sexual, desarrollo, crecimiento y comportamiento reproductivo (Vasconcellos y col 2011). El efecto  
58 sistémico del estrógeno requiere necesariamente la presencia de receptores intracelulares en las células  
59 dianas, donde la formación del complejo hormona-receptor genera la activación de numerosos genes  
60 cuyos productos de expresión finalmente producen efectos morfo-funcionales como los anteriormente  
61 descritos (Ing y Tornesi 1997, Evans 1988). De este modo, el nivel de expresión celular y distribución  
62 histológica de las proteínas receptoras determinan esencialmente el efecto de la acción hormonal de los  
63 estrógenos (Vasconcellos y col 2009, Vasconcellos y col 2011). En mamíferos, se han descrito dos  
64 subtipos de receptores de estrógeno, denominados alfa y beta respectivamente (RE- $\alpha$  y RE- $\beta$ ), siendo  
65 RE- $\alpha$ , más predominante en cuanto a su expresión a nivel endometrial (Meikle y col 2000). Estos  
66 receptores, se han detectado en este tejido, en algunas especies de mamíferos durante la etapa  
67 prepuberal (Meikle y col 2000) sin que a la fecha se comprenda cual es el papel funcional de dicha  
68 expresión en hembras prepúberes. Factores genéticos como la raza podrían estar relacionados con el  
69 nivel de expresión de estos receptores (Vasconcellos y col 2009, 2011, 2012). Por ejemplo, las ovejas  
70 de raza Texel a diferencia de la raza Criolla Araucana tienen mayores índices de prolificidad,  
71 presentando un alto porcentaje de gestación múltiple lo cual podría tener relación con una mayor  
72 expresión de receptores estrogénicos en el sistema reproductivo (Vasconcellos y col 2011). No existen  
73 estudios en los cuales se hayan analizado los niveles de expresión diferencial de RE- $\alpha$  entre distintas  
74 razas de ovejas. De este modo el propósito de este trabajo fue evaluar comparativamente el nivel  
75 transcripcional de los RE- $\alpha$  en ovario de ovejas de prolificidad estándar (Criolla Araucana) y de alta  
76 prolificidad (Texel).

77

## 78 MATERIAL Y MÉTODOS

79 Animales utilizados y obtención de muestras biológicas.

80 La investigación se realizó con muestras de tejido ovárico obtenidas de 3 ovejas de raza Criolla  
81 Araucana y 3 ovejas de raza Texel todas de 4 meses de edad. Los animales fueron mantenidos con  
82 alimentación estándar y fotoperiodo natural en el Campo Experimental Maquehue de La Universidad  
83 de La Frontera, Temuco, Chile. Antes de la extracción de las muestras biológicas, los animales fueron  
84 sacrificados por administración de pentobarbital sódico (100 a 200 mg/Kg) vía intravenosa (Andrews y  
85 col 1993, Bolant y col 1990, Gnanalingham y col 2005) y de acuerdo al consentimiento del Comité de  
86 Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Frontera. Para el estudio se realizó la  
87 extracción del sistema reproductor obteniendo ambos ovarios, los cuales fueron almacenado a -80°C  
88 para posterior extracción de ARN.

89  
90 *Análisis de expresión del transcrito de RE- $\alpha$  por RT-PCR en Tiempo Real*

91

92 *Obtención de partidores para la amplificación de RE*

93 Los partidores utilizados para el análisis de expresión transcripcional del RE- $\alpha$ , se derivaron a  
94 partir de la secuencia del ADNc del receptor de *Ovis aries* disponible en la base de datos *GenBank*  
95 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Cuadro 1). El diseño bioinformático de los partidores se efectuó  
96 utilizando el programa Primer3 disponible en <http://primer3.sourceforge.net/>. Los partidores utilizados  
97 para amplificar el ADNc de  $\beta$ -actina son los descritos por Dzidic y col 2004. (Cuadro 1).

98

99 *Extracción de ARN total*

100 La extracción de ARN total se realizó a partir de 0,5 gr de tejido ovárico de ambas razas,  
101 mediante el uso del Kit “AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit” (Axygen Biosciences, USA).  
102 Para estimar la concentración del ARN obtenido se utilizó la ecuación  $[\text{ARN}] = \text{OD}_{260} \times \text{FD} \times 40$   
103  $\mu\text{g/ml}$ , donde FD es el factor de dilución utilizado y OD260 la absorbancia medida a 260 nm  
104 (Sambrook y col 1989). Mientras que la pureza se evaluó mediante la razón de absorbancia  
105  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ , considerado valores de 1,75 a 1,95 como buena estimación de pureza (Sambrook y col  
106 1989).

107

108

109 *Preparación de ADN complementario (ADNc)*

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

116 El ADNc utilizado para la obtención de la curva estándar se preparó a partir de 0,2 µg de ARN  
117 mensajero provisto por el kit “High Capacity RNA to cDNA Kit” (Applied Biosystems, USA). Para  
118 ello, se utilizaron 4 µl del ARN mensajero a 0,05 µg/µl, el cual se mezcló con 10 µl de buffer RT 2X y  
119 6 µl de agua ultrapura para un volumen final de reacción de 20 µl. Luego se incubó 37°C por 60  
120 minutos, finalizando la reacción de transcripción calentando a 75°C por 5 minutos.

121

122 *Cuantificación relativa mediante el método  $\Delta\Delta Ct$*

123 El nivel de expresión relativo del transcrito de RE- $\alpha$ , se evaluó por medio de RT-PCR en  
124 Tiempo Real mediante el método “Comparative Ct ( $\Delta\Delta Ct$ )” (Livak y Schmittgen 2001) implementado  
125 en el sistema de amplificación en tiempo real “Step One” de Applied Biosystem (USA). El ADNc  
126 obtenido se utilizó como templado para la amplificación específica del RE- $\alpha$  y de  $\beta$ -actina cuya  
127 expresión constitutiva se utilizó como gen normalizante. Ambos ADNc, se amplificaron mezclando 1µl  
128 del respectivo ADNc con 6 µl de buffer de reacción 2X incluido en el kit” Maxima SYBR Green  
129 Master Mix 2X Rox” (Thermo Scientific, USA), 3 µl de agua ultrapura, 1 µl de cada partidador (ESRA-F  
130 y ESRA-R; Cuadro 1) para completar un volumen de reacción final de 12 µl. El ADNc de  $\beta$ -actina se  
131 amplificó con mezclas de reacciones similares a las descritas para RE- $\alpha$ , pero utilizando los partidores  
132 específicos OB-A y OB-S (Cuadro 1). Las condiciones térmicas de amplificación para RE- $\alpha$  y  $\beta$ -actina  
133 fueron similares, programándose con un ciclo inicial de 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos  
134 compuestos por desnaturalización a 95°C por 35 segundos, hibridación a 60°C por 35 segundos y  
135 extensión a 72°C por 35 segundos. Se programó al término de los 40 ciclos de amplificación, un ciclo  
136 para el análisis de fusión de los amplicones, lo cual permitió evaluar la especificidad de la reacción y  
137 descartar de este modo el efecto de productos no específicos sobre la cuantificación. Las condiciones  
138 térmicas fueron de 95°C por 15 segundos, 60°C por un minuto y 95°C por 15 segundos.

139

#### 140 *Cuantificación absoluta utilizando curva estándar*

141 El nivel de expresión absoluta del transcrito de RE- $\alpha$  se evaluó mediante el método  
142 “Quantitation - Standard Curve” (Rutledge y Côté 2003) implementado en el sistema de amplificación  
143 en Tiempo Real “*Step One*” de Applied Biosystem (USA). Se utilizaron diluciones seriadas del ADNc  
144 para la obtención de la curva estándar (10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 y 0,0001 ng/ $\mu$ l). La reacción de PCR se  
145 preparó mezclando 2  $\mu$ l de ADNc, 10  $\mu$ l de buffer de reacción 2x incluido en el kit “Maxima SYBR  
146 Green qPCR Master Mix 2X Rox” (Fermentas, USA), 7  $\mu$ l de agua ultrapura y 0,5  $\mu$ l de cada partidor  
147 (GAPDH-F y GAPDH-R; Cuadro 1), para completar un volumen de reacción final de 20  $\mu$ l. Las  
148 condiciones térmicas de amplificación se programaron con un ciclo inicial de 10 minutos a 95°C,  
149 seguido por 40 ciclos compuestos por una desnaturalización a 95°C por 20 segundos, hibridación a  
150 60°C por 25 segundos y extensión a 72°C por 35 segundos. Se programó el término de los 40 ciclos de  
151 amplificación, un ciclo para el análisis de fusión de los amplicones, lo cual permitió evaluar la  
152 especificidad y descartar de este modo el efecto de productos no específicos sobre la cuantificación.  
153 Las condiciones térmicas fueron de 95°C por 15 segundos, 60°C por un minuto y 95°C por 15  
154 segundos.

155

#### 156 *Análisis estadístico*

157 La significancia estadística de las diferencias de los valores de expresión transcripcional de RE-  
158  $\alpha$  entre ovarios de ovejas Texel y Criolla Araucana se evaluó mediante el método de T de Student,  
159 considerando un nivel de significancia del 95% ( $p < 0,05$ ). Se utilizó el programa GraphPad Prism 5.0  
160 para Windows (GraphPad Software Inc, USA).

161

#### 162 **RESULTADOS**

163 La diferencia en el nivel de expresión relativa del transcrito del RE- $\alpha$  entre ovejas Texel y  
164 Criolla Araucana fue cuantificado primariamente mediante el método “Comparative Ct” ( $\Delta\Delta Ct$ ) según  
165 (Livak y Schmittgen 2001; Matamala y col 2010) (Figura 1). Las curvas de fusión de las amplicones de  
166 RE- $\alpha$  y  $\beta$ -actina generaron temperaturas de fusión ( $T_m$ ) de 81,5°C y 85,0°C respectivamente (Figura 2).  
167 La visualización de los amplicones realizada en un gel de agarosa al 2% confirma la amplificación del  
168 ADNc de ambos genes (Figura 3). De acuerdo a los valores de expresión relativa (RQ) obtenidos las  
169 ovejas Texel, de alta prolificidad presentan un mayor nivel de expresión del RE- $\alpha$  en tejido ovárico en

170 relación a las ovejas Araucana, de prolificidad estándar, presentando la raza Texel 2,35 veces más  
171 expresión que en la raza Araucana (Figura 4). La cuantificación absoluta se basó en el cálculo de la  
172 concentración del templado en las muestras interpolando los valores con una curva estándar preparada  
173 con concentraciones de valores conocidos (Figura 6). Las curvas de fusión de los amplicones GAPDH  
174 no muestran amplificación de productos inespecíficos, mostrado una sola  $T_m$  de 86,4°C. De acuerdo a  
175 los valores de la ecuación de la recta dados por la curva estándar, como son la pendiente, el intercepto y  
176 el ciclo umbral ( $C_t$ ) permitió extrapolar la concentración de templado en la muestra problema (Figura  
177 6). Obteniendo una concentración promedio de 0,038 pg/ $\mu$ l en Araucana y de 0,056 pg/ $\mu$ l en Texel,  
178 presentando una diferencia de concentración de 0,018 pg. El análisis estadístico reveló una diferencia  
179 significativa ( $p < 0,05$ ) entre los valores de expresión de acuerdo al método de cuantificación absoluta  
180 utilizado. Esto indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre el nivel de expresión  
181 transcripcional del RE- $\alpha$  entre ovarios de ovejas Araucana y Texel.

182

## 183 DISCUSIÓN

184 Los estrógenos son hormonas relevantes para el desarrollo y control de funciones reproductivas  
185 en mamíferos, y sus efectos son mediados a nivel celular por receptores específicos cuya expresión  
186 determina la distribución y efectividad del efecto hormonal (Rothschild y col 1996, Ihionkhan y col  
187 2002). La presencia de RE- $\alpha$  se ha estudiado en el tracto genital de distintas especies y se ha  
188 demostrado diferencias entre ellas, mientras que en ovejas el RE- $\alpha$  se encuentra en altas  
189 concentraciones en el útero y oviductos de animales prepúberes (Garfolo y Tasende 1996; Meikle y col  
190 1997; 2001 y 2004), en perros estos receptores son indetectables en este estado del desarrollo (Lessey  
191 y col 1981; Vasconcellos y col 2006).

192 La evaluación del nivel de expresión del transcrito de RE- $\alpha$  en ovario de hembra prepúber  
193 mediante un método de cuantificación relativa y otro de cuantificación absoluta indica un mayor nivel  
194 de expresión en ovejas de raza Texel respecto a Criolla Araucana coincidiendo con el análisis de  
195 expresión de RE mediante inmunohistoquímica en estas mismas razas realizados por Vasconcellos y  
196 Paredes (2012). Esto confirma que tanto a nivel del transcrito como de la proteína receptora existen  
197 diferencias significativas entre estas razas. También se ha detectado expresión de receptores de  
198 estrógeno fisiológicamente activos en endometrio de hembras prepúberes de otras razas ovinas (Meikle  
199 y col 2000, Vasconcellos y col 2010), sin embargo, aún, no se comprende el significado funcional de

200 la expresión temprana del RE- $\alpha$  en hembras prepúberes, es posible que esto produzca una estimulación  
201 temprana del desarrollo del sistema reproductivo y de la actividad sexual del animal favoreciendo de  
202 algún modo su adaptación a condiciones ambientales favorables. Según Vasconcellos y Paredes (2012),  
203 se plantea que la alta prolificidad de las ovejas de raza Texel podría estar relacionada con una mayor  
204 expresión de los RE- $\alpha$  en el sistema reproductivo. Evidentemente la capacidad reproductiva de las  
205 ovejas no solo depende del nivel de expresión del RE, sino también de diversos factores como son los  
206 genéticos y exógenos siendo necesarios estudios multifactoriales que permitan verificar esta hipótesis.

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

## 224 RESUMEN

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

237

238 Palabras claves: receptor de estrógeno, Texel, Criolla Araucana, RT-PCR cuantitativo en Tiempo Real.

239

## 240 AGRADECIMIENTOS

241 Se agradece al Laboratorio de Investigación en Biotecnología Animal (LINBA) de la Universidad de  
242 La Frontera por el apoyo en la realización de este trabajo.

243 Se agradece a la Dirección de Investigación de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, por el  
244 apoyo económico entregado, mediante el proyecto DIUFRO 12-0027.

245

246

247

248

249

## 250 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

251

252 Andrews E J, B T Bennett, J D Clark, K A Houpt, P J Pascoe, G W Robinson, J R Boyce. 1993. Report  
253 of the AVMA Panel on Euthanasia. *J Am Vet Med Assoc* 202 (2), 229-249.

254

255 Bolant B, M A Calvo, D Cejalvo, L O Gimeno, L Gimeno, J M Lloris. 1990. La eutanasia en los  
256 animales de laboratorio. Centro de investigación. Hospital General Universitario de Valencia.  
257 Research in surgery, suplemento 5.

258

259 Dzidic A, M Kaps, R M Bruckmaier. 2004. Machine milking of Istrian dairy crossbreed ewes: Udder  
260 morphology and milking characteristics. *Small Rum Res* 55(3), 183-9.

261

262 Evans R M. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240 (4854), 889-895.

263

264 Garfolo E G, C Tasende. 1996. Uterine estrogen and progesterone receptors in prepuberal ewe  
265 distribution in myometrium, endometrium, and caruncles. *Vet Res* 27, 177-3.

266

267 Gnanalingham M G, A Mostyn, M E Symonds, T Stephenson. 2005. Ontogeny and nutritional  
268 programming of adiposity in sheep: potential role of glucocorticoid action and uncoupling  
269 protein-2. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289, 1407-1415

270

271 Ihionkhan C E, K L Chambliss, L L Gibson, L D Hahner, M E Mendelsohn, P W Shaul. 2002.  
272 Estrogen Causes Dynamic Alterations in Endothelial Estrogen Receptor Expression. *Circ Res*  
273 91, 814-820.

274

275 Ing N H, T L Ott. 1999. Estradiol up-regulates estrogen receptor- $\alpha$  messenger ribonucleic acid in sheep  
276 endometrium by increasing its stability. *Biol Reprod* 60, 134-9.

277

278 Ing N H, M B Tornesi. 1997. Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene  
279 expression in specific ovine uterine cells. *Biol Reprod* 56, 1205-1215.

280

- 281 Lessey BA, R Wahawisan, TA Gorell. 1981. Hormone regulation of cytoplasmic estrogen and  
282 progesterone receptors in the beagle uterus and oviduct. *Moll Cell Endocrinol* 21(2), 171-80.  
283
- 284 Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative  
285 PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25, 402-408.  
286
- 287 Matalama F, M Paredes, R Cornejo. 2010. Efecto del láser de baja energía sobre la expresión de GAP-  
288 43 (growth associated protein 43) en nervio isquiático de rata. *Int. J. Morphol* 28(3), 815-821.  
289
- 290 Meikle A, A Bielli, B Masironi, G Pedrana, H Wang, M Forsberg, L Sahlin. 2000. An  
291 immunohistochemical study on the regulation of estrogen receptor  $\alpha$  by estradiol in the  
292 endometrium of the immature ewe. *Reprod. Nutr. Dev* 40, 587-596.  
293
- 294 Meikle A, EG Garófalo, M Rodriguez-Piñon, C Tasende, L Shalin. 2001. Regulation by gonadal  
295 steroids of estrogen and progesterone receptors along the reproductive tract in female lambs.  
296 *Acta Vet Scand* 42(1), 161-9.  
297
- 298 Meikle A, C Tasende, M Rodriguez, EG Garófalo. 1997. Effects of estradiol and progesterone on the  
299 reproductive tract and on uterine sex steroid receptors in female lambs. *Theriogenology* 48(7),  
300 1105-13.  
301
- 302 Meikle A, C Tasende, C Sosa, EG Garófalo. 2004. The rol of sex steroid receptors in sheep female  
303 reproductive physiology. *Reprod Fertil Dev* 16 (4), 385-94  
304
- 305 Rothschild M, C Jacobson, D Vaske, C Tuggle, L Wang, T Short, G Eckardt, S Sasaki, A Vincent, D  
306 McLaren, O Southwood, H Van Der Steen, A Mileham, G Plastow. 1996. The estrogen receptor  
307 locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci* 93,  
308 201-205.  
309
- 310 Rutledge R G, C Côté. 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard  
311 curves. *Nucleic Acids Res* 31(16), e93.

- 312 Sambrook J, E F Fritsch, T Maniatis. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold  
313 Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N Y, Pp 1659.  
314
- 315 Vasconcellos A, M Paredes 2012. Detección inmunohistoquímica del receptor de estrógeno en el  
316 endometrio de ovejas de alta prolificidad y de prolificidad estándar. *Int. J. Morphol.* 30(3),  
317 1090-1093.
- 318 Vasconcellos A, BN Sepúlveda, CC Pacheco. 2006. Presencia de receptores de estrógeno, progesterona  
319 y de CBG en el tracto genital de ovejas y de perras. Estudio inmunocitoquímico. *Int. J. Morphol*  
320 24(3), 457-62.
- 321 Vasconcellos A, M Paredes, E Barrientos, Y Olmazábal, D Nuñez, J Navarrete, B Molina. 2009.  
322 Análisis de la expresión del receptor del estrógeno en endometrio de ovejas alimentadas con  
323 dieta normal y dieta suplementada. *Int. J. Morphol* 27(4), 1093-1098.
- 324 Vasconcellos A, M Paredes, C Hernández, D Muñoz, J Navarrete. 2011. Expresión de receptores de  
325 estrógenos y progesterona en el tracto genital de ovejas raza Texel. *Int. J. Morphol* 29(4), 1268-  
326 1273.  
327
- 328 Vasconcellos A, Paredes M, Núñez D, Barrientos E, Olmazábal Y, Navarrete J. 2010. Study of the  
329 Expression of Progesterone Receptors in the Endometrium of Ewes with Normal and  
330 Supplementary Diet. *Int. J. Morphol* 28(2), 575-8.  
331
- 332 Vasconcellos A, N Sepúlveda, J Castillo, C Rosas. 2005. Presencia de receptores des estrógeno y de  
333 progesterona en el endometrio de ovejas prepúberes. Estudio inmunocitoquímico. *Int J Morphol*  
334 23(4), 393-396  
335  
336  
337  
338

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

342 Chart 1. Oligonucleotides sequences used as primer for cDNA amplification reactions of the estrogen  
 343 receptor (ESRA-F/ESRA-R),  $\beta$ -actin (OB-S/OB-A) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase  
 344 (GAPDH-F y GAPDH-R).

Secuencias de partidores	Nº acceso a Gen Bank Fuente Bibliográfica	Concentración
ESRA-F: AGGATTCACCTAGCGCTTCA	AY033393	10 pmol/ $\mu$ l
ESRA-R: CAGCCATGCAACAGAGAAAA	AY033393	
OB-S: AACTCCATCATGAAGTGTGAC	Dzidic y col 2004	25 pmol/ $\mu$ l
OB-A: GATCCACATCTGCTGGAAGG	Dzidic y col 2004	
GAPDH-F: CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG	Fermentas, First Strand	10 $\mu$ M
GAPDH-R: GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG	cDNA Synthesis Kit	

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

**Normalización**

$$\begin{array}{rclcl} \text{Ct RE} & - & \text{Ct } \beta\text{-actina} & = & \Delta\text{Ct}_1 \\ \text{(Muestra problema)} & & \text{(Control endógeno)} & & \\ \text{Ct RE} & - & \text{Ct } \beta\text{-actina} & = & \Delta\text{Ct}_2 \\ \text{(Muestra referencia)} & & \text{(Control endógeno)} & & \end{array}$$

**Obtención del RQ (unidades de expresión relativa)**

$$\Delta\text{Ct}_1 - \Delta\text{Ct}_2 = \Delta\Delta\text{Ct}$$

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = \text{RQ}$$

357

358 Figura 1. Método de cuantificación utilizado para evaluar el nivel de expresión relativa del transcrito de  
 359 RE- $\alpha$  en tejido ovárico de ovejas de razas Texel y Criolla Araucana. La cuantificación relativa  
 360 mediante el método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  se determinó respecto a la expresión de la muestra de referencia utilizada  
 361 (Criolla Araucana). La expresión transcripcional de  $\beta$ -actina se utilizó como gen normalizador de la  
 362 expresión de RE- $\alpha$  (Matamala y col 2010).

363 Figure 1. Quantification method used to assess the relative level of expression of ER- $\alpha$  transcribed in  
 364 ovarian tissue of Texel and Criolla Araucana race. The relative quantification method  $\Delta\Delta\text{Ct}$  was  
 365 determined about the used reference sample expression (Criolla Araucana). The transcriptional  
 366 expression of  $\beta$ -actin was used as normalizing gene of the ER- $\alpha$  expression (Matamala y col 2010).

367

368

369

370

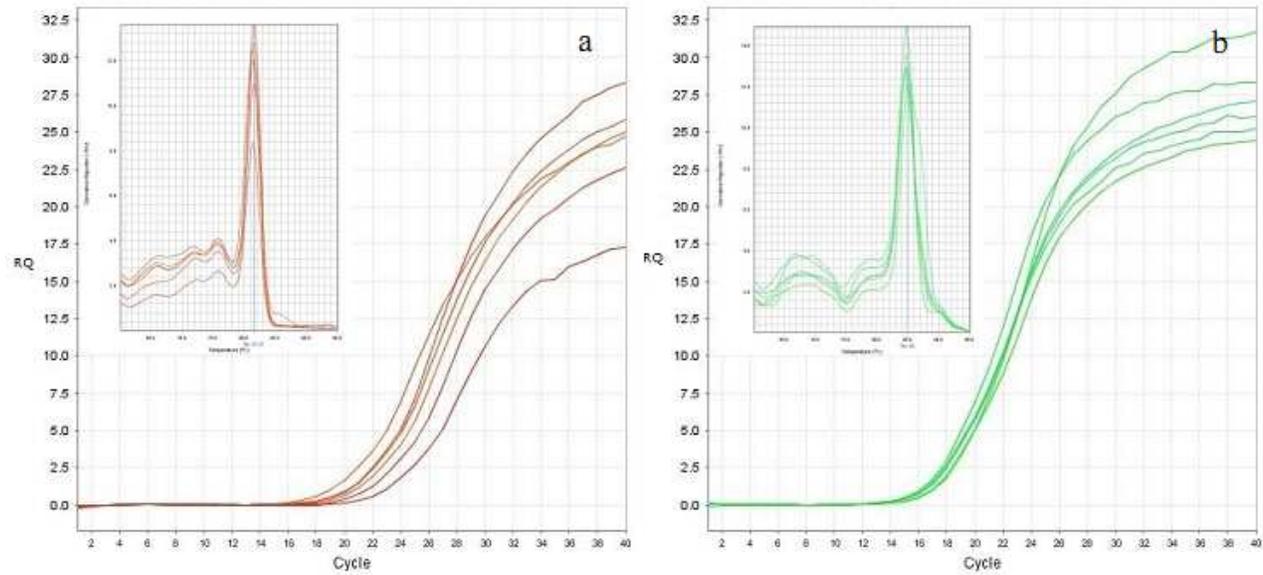
371

372

373

374

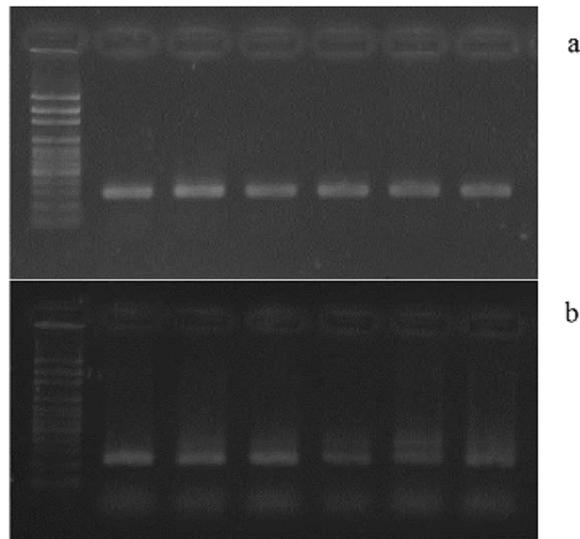
375



376

377 Figura 2. Curvas de amplificación y de fusión (recuadro interior) de los amplicones del receptor de  
 378 estrógeno (a) y  $\beta$ -actina (b) en ovejas de raza Texel y Criolla Araucana.

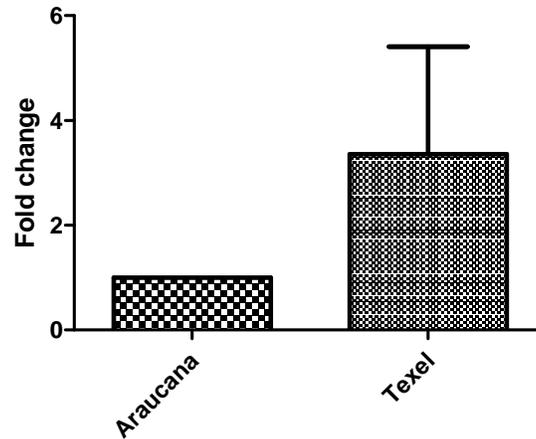
379 Figure 2. Amplification and melting curves (figure inside) of the estrogen receptor amplicons (a) and  $\beta$ -  
 380 actin amplicons (b) Texel and Criolla Araucana sheep.



381

382 Figura 3. Electroforesis en geles de agarosa al 2% de los productos de PCR del  $\beta$ -actina (a) y RE- $\alpha$   
 383 (b).

384 Figure 3. Agarosa gel electrophoresis 2% of PCR products of  $\beta$ -actin (a) and ER- $\alpha$  (b).



385

386 Figura 4. Análisis del nivel de expresión relativa del gen RE- $\alpha$  en tejido ovárico de ovejas Texel y  
387 Criolla Araucana según el método Comparative  $\Delta\Delta$ Ct. Los valores de expresión del transcrito de RE- $\alpha$   
388 se representan en unidades relativas definidas como “número de veces” o fold change respecto a la  
389 expresión de la muestra de referencia (Criolla Araucana), cuyo valor es 1. El gráfico representa los  
390 promedios de 3 medidas independientes.  $P < 0,05$ .

391 Figure 4. Analysis of relative expression level of ER- $\alpha$  gene in ovarian tissue of Texel and Criolla  
392 Araucana sheep according to the  $\Delta\Delta$ Ct method. The values of transcript expression of ER- $\alpha$  are  
393 represented in relative units defined as fold change regarding to the expression of the reference sample  
394 (Criolla Araucana), whose value is 1. he graph represents the average of three independent  
395 measurements.  $P < 0.05$ .

396

397

398

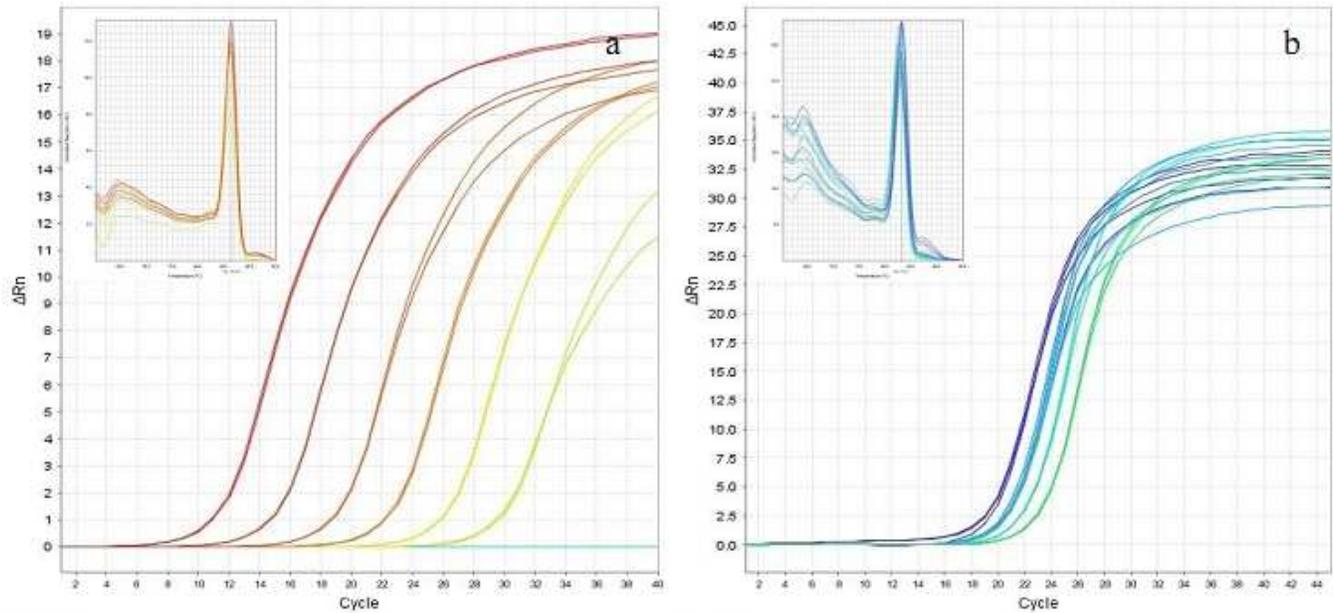
399

400

401

402

403



404

405 Figura 5. Curvas de amplificación y de fusión (recuadro interior) de la curva estándar del gen GAPDH  
 406 (a) y del gen del RE- $\alpha$  (b).

407 Figure 5. Amplification and melting curves (figure inside) of the GAPDH gene standard curve (a) and  
 408 ER- $\alpha$  (b).

409

410

411

412

413

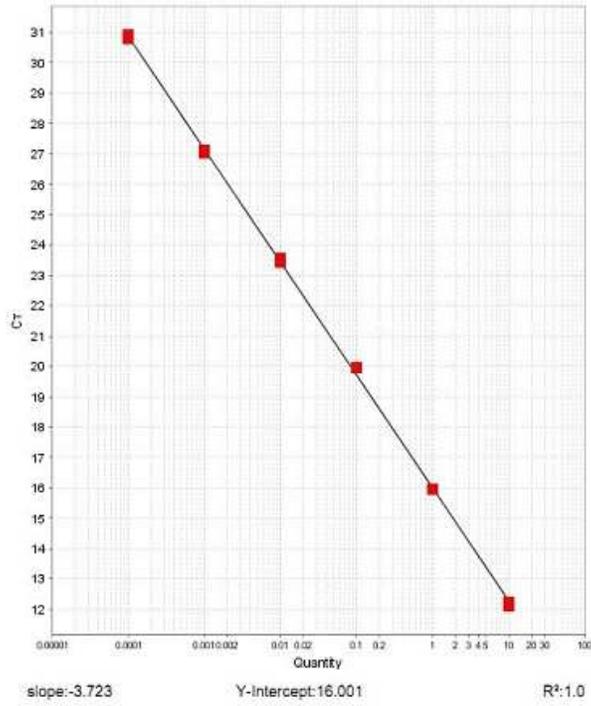
414

415

416

417

418



419

420 Figura 6. Curva estándar del gen GAPDH. Se utilizaron 6 puntos para realizar la curva, con una réplica  
421 cada uno. La cantidad inicial es de 10 ng y el factor de dilución de 1:10.

422 Figure 6. GAPDH gene standard curve. Six points were used to perform the curve, with each replica.  
423 The initial quantity is 10 ng and the dilution factor is 1:10.

424

425

426

427

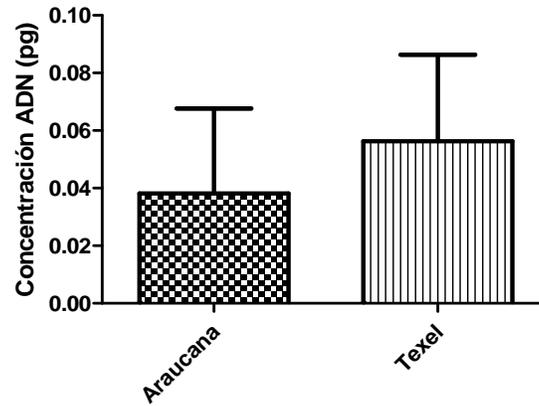
428

429

430

431

432



433

434 Figura 7. Análisis de la cuantificación absoluta del gen RE- $\alpha$  en ovejas de raza Texel y Criolla  
435 Araucana en relación a una curva estándar. La concentración de ADN de RE se presenta en picogramos  
436 (pg). El gráfico representa los promedios de 6 medidas independientes.  $P < 0,05$ .

437 Figure 7. Absolute quantitation analysis of ER- $\alpha$  gene in Texel and Criolla Araucana sheep regarding  
438 to a standard curve. The DNA concentration of ER present in picogram (pg). The graph represents the  
439 average of six independent measurements.  $P < 0,05$ .