

01669  
5  
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

**EFFECTO DEL LIQUIDO FOLICULAR EQUINO EN  
LA SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES OVINOS  
TRANSFERIDOS ASINCRONICAMENTE**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN PRODUCCION ANIMAL  
REPRODUCCION  
PRESENTA :

**MEJA VILLANUEVA VICENTE OCTAVIO**

ASESORES: DR. LUIS ZARCO QUINTERO,  
DR. JAVIER VALENCIA MENDEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA

1995

FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, pero en especial a la pequeña Montserrat por su oportuna aparición.

A Ana Ma. Rosales y a Gabriela Flores-Foxworth.

A mis asesores Luis Zarco Quintero y Javier Valencia Méndez: por su valiosa participación. Por su amistad y confianza.

A Carolina Luyando y Alberto Balcázar, autores también de esta tesis: por ayudarme a demostrar que el trabajo en equipo es factible y deseable. Por su amistad tan esencial.

A Javier Olivares: por ayudarme a entender la realidad de nuestro México.

A Héctor Castillo: por tus consejos que inclinaron (afortunadamente) la balanza hacia este espacio de trabajo.

Al carnal Fernando Borderas y a Magda: por compartir la oligofrenia y amistad en realidades cotidianas y alternas. Por tu ayuda en el análisis estadístico de los resultados.

A los miembros del Departamento de Reproducción: Mariana, Rosa Páramo, Adriana, Miriam, Dr. Carlos Galina, Carlos Esquivel, Joel, Dr. Porras, Romo; Susana y Clara (por su participación en el procesamiento del líquido folicular y de los RIA para las determinaciones de P4); Paco Quintero, Jorge A. Alvarez, Oscar Castro y Lorena.

Verónica Caballero y Verónica Campos, Karla, Chepo, Ramón e Israel (por su colaboración en las colecciones y transferencias de embriones realizadas).

A los trabajadores del CEPIER.

A los colegas (y ex) del CEPIER: Andrés Ducóing, Julio Cervantes, Karla Blasco, Adriana, Javier, Abel, Aldo y Adolfo: por su importante apoyo para obtener y mantener a las ovejas utilizadas en el experimento de la tesis.

Al CONACYT: por facilitarme la beca-crédito para la realización de mis estudios de Maestría.

A la DGAPA de la UNAM: por su apoyo económico dentro del PAPIIT con el proyecto IN201393.

A la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la FMVZ de la UNAM: por su apoyo académico y económico.

Al Dr. Rogelio Flores del Laboratorio Intervet México.

A Evelyn Aldaz Vélez y Alejandra Arellano Bernal: por demostrar cotidianamente que las mujeres son lo más hermoso e interesante de este mundo.

A Rosalinda Aldaz.

A Maye.

## INDICE

TEMAS	PAGINAS
<b>I RESUMEN</b>	5
<b>II INTRODUCCION</b>	6
<b>IV REVISION DE LITERATURA</b>	
- Regresión del cuerpo lúteo en los rumiantes	10
- Luteólisis prematura	13
- Reconocimiento materno de la gestación	14
- Reconocimiento de la gestación en la oveja	15
- Requerimientos de sincronía útero-embrión	19
- Líquido folicular e inhibina	22
<b>III MATERIAL Y METODOS</b>	
- Trabajo experimental	28
- Animales experimentales	28
- Transferencia de embriones	29
- Administración de líquido folicular y toma de muestras	31
- Determinación de progesterona por radioinmunoanálisis	31
- Diagnóstico de gestación	31
- Obtención y procesamiento del líquido folicular equino	32
- Análisis estadísticos	33
<b>V RESULTADOS</b>	34
<b>VI DISCUSION</b>	46
<b>VII CONCLUSIONES</b>	51
<b>VIII LITERATURA CITADA</b>	52

## RESUMEN

Mejía, O.

### **EFFECTO DEL LIQUIDO FOLICULAR EQUINO EN LA SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES OVINOS TRANSFERIDOS ASINCRONICAMENTE.**

Asesores: Zarco, L. y Valencia, J.

El presente estudio se realizó con la finalidad de determinar si la administración de líquido folicular equino retrasa la luteólisis y permite el reconocimiento de la gestación de embriones en asincronía. Se transfirieron dos embriones en estado de mórula o blastocito colectados el día 6 postestro a cada una de las 31 receptoras que se dividieron en tres grupos. El primer grupo quedó integrado por 11 ovejas a las que se les administró líquido folicular equino, cada 8 horas durante 12 días y que se encontraban en el día 9 postestro al momento de la transferencia (grupo asincrónico/lfe). Al segundo grupo se asignaron 11 hembras en asincronía (día 9 postestro) que no recibieron líquido folicular (grupo asincrónico). El tercer grupo se formó con 9 ovejas en sincronía en relación con el ciclo estral de las hembras donadoras de los embriones (día 6 postestro). Los porcentajes de fertilidad fueron de 36.36%, 63.63% y 77.77% para las receptoras de los grupos asincrónico/lfe, asincrónico y sincrónico respectivamente, sin que se encontraran diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ). Los niveles de la progesterona plasmática en las hembras gestantes de los grupos en asincronía fueron generalmente mayores que los de las hembras gestantes del grupo en sincronía. En las ovejas que no quedaron gestantes en el grupo asincrónico tratado con líquido folicular se presentaron dos tipos diferentes de comportamiento lúteo: en cuatro de ellas ocurrió la luteólisis en forma normal, reduciéndose las concentraciones de progesterona a menos de 1 ng/ml en el día 16 ó 17 del ciclo estral; en las otras tres se produjo un retraso en la regresión del cuerpo lúteo, manteniéndose la producción de progesterona hasta por lo menos el día 21 postestro. La prolificidad de las hembras gestantes fue de 1.25, 1.28 y 1.77 para los grupos asincrónico/lfe, asincrónico y sincrónico respectivamente. Aunque el número de corderos nacidos fue mayor en el grupo sincrónico que en los grupos asincrónicos, solamente existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos asincrónico/lfe y sincrónico ( $p < 0.05$ ).

En este trabajo no pudo demostrarse que la administración de líquido folicular equino retrasa la luteólisis y permite el reconocimiento de la gestación en las ovejas receptoras de embriones con 3 días de asincronía.

# EFFECTO DEL LIQUIDO FOLICULAR EQUINO EN LA SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES OVINOS TRANSFERIDOS ASINCRONICAMENTE.

## INTRODUCCION

En animales como la oveja y la vaca existe un número importante de muertes embrionarias, calculándose que entre un 25% y un 40% de las concepciones terminan en la muerte del embrión (Roberts and Scaluc-Francis, 1990; Hafez, 1993). Esta mortalidad embrionaria puede deberse tanto a factores maternos como embrionarios, así como a la interacción entre éstos.

Los eventos que permiten el reconocimiento de la gestación tienen una relación cronológica muy precisa, ya que el útero de la oveja está programado para iniciar la secreción luteolítica de prostaglandina F2  $\alpha$  (PGF2  $\alpha$ ) en el día 13 ó 14 postovulación (Zarco et al, 1988a), apenas un día después de que un embrión normal comienza a producir cantidades apreciables del factor antiluteolítico, que es una proteína trofoblástica, denominada proteína trofoblástica ovina-1 (oTP-1) (Roberts and Scaluc-Francis, 1990).

Por esta razón, cualquier retraso en el desarrollo embrionario puede resultar en una falla en el reconocimiento de la gestación, lo que origina que se inicie la lisis o destrucción del cuerpo lúteo.

En rumiantes existen diversas causas de retraso en el desarrollo embrionario. Una de ellas es el estrés calórico, que resulta en alteraciones del ambiente uterino que de alguna manera inhiben el desarrollo embrionario y retrasan la secreción de las proteínas trofoblásticas responsables del reconocimiento materno de la gestación (Thatcher et al, 1986; Putney et al, 1988).

Otra causa importante de infertilidad es la regresión prematura del cuerpo lúteo debida a un adelanto en la liberación de la PGF2  $\alpha$  (Southec et al, 1988a,b; Copelin et al, 1989; Hunter et al, 1989; Peter et al, 1989; Cooper et al, 1991), por lo que en recientes investigaciones se ha buscado retrasar la secreción uterina de PGF2  $\alpha$ .

Algunos de los tratamientos que se han utilizado para evitar la lisis del cuerpo lúteo son los inhibidores de la síntesis de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , como el flunixin meglumine, la indometacina, el ácido acetil salicílico o ácido meclofenámico y la hidrocortisona (Vane *et al* , 1971; Barcikowski *et al* , 1974; Cooke and Homeida, 1983; Flint *et al* , 1983; Gilbert *et al* , 1990; Odensvik and Gustafsson, 1994).

Sin embargo, todos ellos tienen la desventaja de inhibir en forma inespecífica la secreción de todas las series de prostaglandinas, por lo que tienen efectos indeseables y pueden inclusive interferir con la implantación del embrión.

También se ha intentado la aplicación exógena de hormonas como la progesterona (P4), la gonadotropina coriónica humana o la hormona liberadora de las gonadotropinas (Kindahl *et al* , 1981; Gilbert *et al* , 1990; Rajamahendran and Sianangama, 1992). Aunque dichas hormonas son capaces de mantener temporalmente elevadas las concentraciones de la P4, al tener directa o indirectamente una función luteotrópica, no evitan la secreción de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ni la regresión del cuerpo lúteo, por lo que al discontinuarse su uso se produce irremediablemente la caída de las concentraciones de la P4 que es seguida por la muerte del embrión (Kindahl *et al* , 1981).

Otra alternativa ha sido el tratar de adelantar el reconocimiento materno de la gestación mediante la administración de las propias proteínas trofoblásticas ovina o bovina, ya sean purificadas a partir de hembras gestantes (Godkin *et al* , 1984a,b; Ashworth, 1992; Ott *et al* , 1992) o producidas mediante ingeniería genética (proteínas trofoblásticas recombinantes) (Martal *et al* , 1990).

Debido a que las proteínas trofoblásticas responsables del reconocimiento de la gestación pertenecen a la familia de los interferones, también se ha utilizado la administración de interferones alfa o de interferones alfa recombinantes (Thatcher *et al* , 1989; Flint *et al* , 1991; Garverick *et al* , 1992b; Parkinson *et al* , 1992).

Sin embargo, dichas proteínas no se encuentran disponibles en cantidades importantes por lo que su uso es limitado. Además, al menos en el bovino los interferones alfa son pirogénicos y al elevar temporalmente la temperatura corporal del animal, pueden originar mortalidad embrionaria y disminución de la fertilidad (Newton *et al* , 1989).

Alternativamente, se pueden idear mecanismos que permitan inhibir específicamente el establecimiento del patrón de secreción luteolítico pulsátil de la prostaglandina F2  $\alpha$ .

Se conoce que el estradiol y la oxitocina juegan un papel sumamente importante en la generación de los pulsos de PGF2  $\alpha$  (Silvia *et al* , 1991). El estradiol de origen folicular es indispensable tanto para la aparición inicial de receptores para oxitocina, como para su reparación después de cada episodio de secreción de PGF2a (McCracken *et al* , 1984; Sheldrick, 1991). Por lo que la inhibición del desarrollo folicular y por lo tanto la inhibición de la síntesis de estrógenos foliculares podría evitar que se iniciara la secreción luteolítica de PGF2  $\alpha$ .

La hormona folículo estimulante (FSH) es indispensable para la secreción de estrógenos foliculares (Findlay, 1991), ya que estimula el crecimiento, la mitosis y la completa diferenciación de las células de la granulosa de los folículos preovulatorios grandes, permitiendo que adquieran receptores para LH y tengan su máxima actividad aromatizante de andrógenos a estrógenos (Baird *et al* , 1991; McNeilly *et al* , 1991a). La inhibición de la secreción de la FSH permite retrasar el desarrollo folicular (Baird *et al* , 1990), por lo que se puede esperar que también se retrase el inicio de la luteólisis.

Una forma de reducir la secreción de FSH es utilizando inhibina, la cual es una hormona glicoproteica que inhibe selectivamente la secreción hipofisiaria de la hormona folículo estimulante (FSH) (Burger, 1988).

Esta hormona se ha aislado del líquido folicular de diferentes especies (porcinos, ovinos, bovinos y equinos) (Grootenhuis *et al* , 1989; Gremmes, 1990; Roser *et al* , 1994) y para estudiar su efecto se ha utilizado experimentalmente líquido folicular equino o bovino libre de esteroides (Bergfelt and Ginther, 1985; Gremmes, 1990; Baird *et al* , 1991).



Puede pensarse que la administración de líquido folicular equino libre de esteroides, al suprimir selectivamente la secreción de FSH (Roser *et al* , 1994) evitará el desarrollo de los folículos ováricos y por tanto, la secreción ovárica de estradiol (Baird *et al* , 1990), con lo que la serie de eventos fisiológicos que originan la destrucción del cuerpo lúteo no se llevaría a cabo, manteniéndose los niveles de progesterona necesarios para la gestación temprana en la oveja.

Un modelo para evaluar el efecto de este tratamiento puede ser la transferencia de embriones en asincronía, ya que al transferir embriones que se encuentran retrasados en su desarrollo en relación con el ambiente uterino de la hembra receptora, dichos embriones no podrían producir la oTP-1 antes de que la madre iniciara la liberación luteolítica de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (Kindahl, 1994; Odensvik and Gustafsson, 1994), lo que originaría la muerte del embrión transferido en asincronía y la falla en el establecimiento de la gestación en la hembra receptora.

En efecto, se conoce que la transferencia de embriones asincrónicos resulta en un alto porcentaje de fallas en el establecimiento de la gestación (Rowson and Moor, 1966; Lawson *et al* , 1983).

Utilizando este modelo es posible postular que la administración de líquido folicular equino retrasaría el inicio de la luteólisis hasta que el embrión pudiera secretar el factor antiluteolítico, permitiéndose así el establecimiento de la gestación.

Para evaluar lo anterior, en el presente trabajo se plantea como objetivo el realizar la transferencia de embriones en asincronía en relación con el ciclo estral de la oveja receptora y evaluar si la administración de líquido folicular equino retrasa la regresión del cuerpo lúteo y permite el reconocimiento de la gestación.

## REVISION DE LITERATURA.

### REGRESION DEL CUERPO LUTEO EN LOS RUMIANTES.

En las ovejas el establecimiento de un patrón de secreción pulsátil de la prostaglandina  $F2\alpha$  (PGF $2\alpha$ ) por parte del útero, origina la lisis o regresión del cuerpo lúteo (CL) (Zarco *et al* , 1988a; Kindahl, 1994; Niswender *et al* , 1994).

Aunque los mecanismos precisos que regulan la síntesis y secreción de la PGF $2\alpha$  no están completamente claros, se conoce que la progesterona (P4) y el estradiol (E2) ováricos, así como la oxitocina (OT) de origen tanto hipofisiario como ovárico, tienen un papel sumamente importante en la generación de los pulsos de la PGF $2\alpha$  uterina (Vallet *et al* , 1990; Silvia *et al* , 1991; Garverick *et al* , 1992a; Silvia and Raw, 1993).

La P4 proveniente del CL ejerce dos tipos de efectos que contribuyen a la regulación de la secreción de la PGF $2\alpha$ . Por un lado, sensibiliza al útero y lo prepara para su posterior respuesta inicial a la OT, ya que la prolongada exposición a la progesterona durante la fase lútea del ciclo estral promueve la acumulación de las sustancias precursoras necesarias para la síntesis de la PGF $2\alpha$  como son el ácido araquidónico, ácidos grasos o enzimas como la sintetasa de prostaglandinas (McCracken *et al* , 1984; Silvia *et al* , 1991). Por otro lado, la P4 ejerce un efecto regulador del número, frecuencia y amplitud de los pulsos de secreción de la PGF $2\alpha$ , evitando que en el útero aparezcan receptores para estrógenos o causando la destrucción de dichos receptores (Leavitt *et al* , 1985; citado por Lau *et al* , 1992; McCracken *et al* , 1984; Silvia and Raw, 1993).

La P4 regula también la concentración de los receptores endometriales a la oxitocina (Lau *et al* , 1992, 1993). Para que el útero pueda responder a la OT secretando PGF $2\alpha$ , debe haber estado expuesto a la P4 al menos durante 10-12 días (Vallet *et al* , 1990; Lamming *et al* , 1991; Lau *et al* , 1992), ya que después de 10 días de exposición del útero a la P4, esta hormona provoca la destrucción de sus propios receptores en el útero (Vu-hai *et al* , 1977; citado por Lau *et al* , 1993; McCracken *et al* , 1984), por lo que después del día 12 del ciclo estral normal de una oveja la

progesterona deja de bloquear la acumulación de receptores para oxitocina y la concentración de éstos se incrementa (Flint *et al* , 1992).

Además, debido a la disminución del efecto de la P4 sobre el útero hacia el final de la fase lútea, aparecen en el útero receptores para el estradiol ovárico proveniente de los folículos presentes durante la segunda mitad de la fase lútea (Silvia *et al* , 1991). Al contar con sus receptores el estradiol puede actuar y sus pequeños incrementos maximizan la respuesta uterina a la oxitocina, mediante la modulación de la secreción pulsátil de la oxitocina hipofisiaria (Silvia *et al* , 1991) y mediante la estimulación de la síntesis de receptores para oxitocina en el endometrio (Hixon and Flint, 1987; Beard and Lamming, 1994).

El estradiol de origen folicular es indispensable tanto para la aparición inicial de receptores para oxitocina, como para su reaparición después de cada episodio de secreción de la PGF2 $\alpha$  (McCracken *et al* , 1984; Sheldrick, 1991).

La interacción de la oxitocina con sus receptores es importante en el establecimiento del patrón de secreción pulsátil de la PGF2 $\alpha$ , ya que la oxitocina al ser liberada en forma pulsátil, se encarga de iniciar cada episodio de secreción de la PGF2 $\alpha$  por parte del útero (Silvia *et al* , 1991). La oxitocina tanto de origen lúteo como pituitario, interactúa con sus receptores recientemente sintetizados y como consecuencia se desencadena la síntesis de PGF2 $\alpha$  por el útero (McCracken *et al* , 1984).

En las ovejas durante la luteólisis, la secreción de P4 por el cuerpo lúteo disminuye como consecuencia de la acción de la PGF2 $\alpha$ , la cual llega del útero al ovario mediante un mecanismo local de transferencia entre la vena uterina a la arteria ovárica (McCracken *et al* , 1971).

Los niveles séricos de la P4 que se encontraban durante la fase lútea por arriba de 1 ng/ml (3-5 ng/ml) disminuyen drásticamente (.025-.03 ng/ml) en un lapso de 24 horas a partir del inicio de la luteólisis (Zarco *et al* , 1984, 1988a; Zhang *et al* , 1991).

Cada pulso de la PGF2 $\alpha$  uterina estimula la liberación de más oxitocina por el cuerpo lúteo (Moore *et al* , 1986; Lamsa *et al* , 1989; Wathes and Denning-Kendal, 1992) y dicha oxitocina puede a su vez estimular la secreción de la PGF2 $\alpha$  por el útero, estableciéndose un ciclo de retroalimentación positiva entre estas dos hormonas (McCracken *et al* , 1984; Silvia *et al* , 1991; Silvia and Raw, 1993).

La oxitocina de origen lúteo origina una pasajera refractariedad del útero a la subsiguiente estimulación con oxitocina, mediante la autodestrucción de sus propios receptores (McCracken *et al* , 1984). Una desensibilización similar ocurre en el cuerpo lúteo en respuesta a la PGF2 $\alpha$  (Silvia *et al* , 1991). Tanto la recuperación de la capacidad del CL para responder a la PGF2 $\alpha$  como la recuperación de los receptores para la oxitocina tardan alrededor de 6 horas, por lo que la PGF2 $\alpha$  que se secreta en respuesta a la oxitocina será liberada en forma de pulsos con esta misma frecuencia (McCracken *et al* , 1984; Silvia *et al* , 1991).

Durante la regresión natural del CL es importante que se establezca la secreción pulsátil de PGF2 $\alpha$ , ya que se requieren 4 a 6 pulsos secretados con intervalos de 5 a 6 horas entre pulso y pulso para que la luteólisis se complete y sea irreversible (Zarco *et al* , 1984, 1988a). La frecuencia con que se secretan dichos pulsos es muy importante, ya que si los intervalos entre ellos se alargan, la regresión del cuerpo lúteo puede fallar a pesar de haberse secretado grandes cantidades de PGF2 $\alpha$  (Zarco *et al* , 1984). Igualmente, la secreción de grandes cantidades de PGF2 $\alpha$  en forma continua en lugar de pulsátil que ocurre en las ovejas gestantes tampoco resulta en luteólisis (Zarco *et al* , 1988b).

El que la luteólisis sea funcional implica que existan primero cambios bioquímicos en el cuerpo lúteo como la disminución brusca de la secreción de P4, los cuales pueden estar separados de los cambios estructurales posteriores que sufre el cuerpo lúteo (Horton and Poyser, 1976). Dichos cambios estructurales originan la destrucción y pérdida de las células que constituyen al cuerpo lúteo, primero de las células pequeñas y posteriormente de las células grandes, y por tanto la disminución de su peso (Schwall *et al* , 1986; Hansel *et al* , 1991).

Los cambios morfológicos que ocurren durante la regresión del cuerpo lúteo incluyen la acumulación de gotas de lípidos en el citoplasma de las células lúteas, la degeneración de los capilares y un incremento en el número de los lisosomas. Conforme la regresión lútea continúa, existe un eventual decremento en el número de las células lúteas y de su producción de esteroides (Niswender *et al* , 1994).

### **LUTEOLISIS PREMATURA.**

Una de las causas de infertilidad en rumiantes es la regresión del cuerpo lúteo antes de que el embrión haya tenido tiempo de informar de su presencia a la madre (Hunter, 1991; Garverick *et al* , 1992a). Esto puede deberse a un retraso en el desarrollo embrionario (Thatcher *et al* , 1986; Putney *et al* , 1988) , o más comúnmente a un adelanto en la liberación de prostaglandina F<sub>2α</sub> (Hunter, 1991).

En la oveja es común que la ovulación sea seguida por la formación de un cuerpo lúteo de corta duración cuando dicha ovulación no ha sido precedida por un período de exposición a progesterona proveniente de un ciclo estral anterior (Hunter, 1991; Garverick *et al* , 1992a). Así, se presentan fases lúteas cortas después de la primera ovulación puberal (Rodríguez, 1991; Balcázar, 1992), estacional (Walton, 1977; Oldham and Martin, 1979), o postparto (Braden *et al* , 1989), por lo que dichas ovulaciones generalmente son infértiles. También se ha demostrado que la inducción de ovulación utilizando Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) o con la hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) en animales anéstricos, induce en forma repetible la formación de cuerpos lúteos de corta duración (McLeod *et al* , 1982a,b; O'Shea *et al* , 1984; Southee *et al* , 1988a,b; Driancourt *et al* , 1990), por lo que este tratamiento se ha utilizado como un modelo para el estudio de esta deficiencia lútea y su posible prevención (Hunter, 1991; Garverick *et al* , 1992a).

Evidencias recientes han demostrado que el cuerpo lúteo de corta duración es intrínsecamente normal (Hunter *et al* , 1991, Garverick *et al* , 1992a ) y que su corta vida se debe en realidad a

una programación inadecuada de la secreción de prostaglandinas uterinas (Southec *et al* , 1988b; Copelin *et al* , 1989; Hunter *et al* , 1989; Peter *et al* , 1989; Cooper *et al* , 1991).

## RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA GESTACION

El reconocimiento materno de la gestación es el intercambio de señales que establecen el útero materno y el embrión, que permite alargar la vida del cuerpo lúteo, previniendo el retorno a la ciclicidad ovárica (Geisert *et al* , 1992; Roberts *et al* , 1992).

Existen una serie de señales iniciales que se establecen entre el embrión y el útero entre las que se encuentran el Factor Temprano de la Gestación (EPF), el cual se ha detectado entre las 6 a 24 horas después de la inseminación o monta y es una glicoproteína inmunosupresora específica de la preñez y su producción es inducida por el Factor Activador de Plaquetas (PAF) (Roberts *et al* , 1990). Existe también un factor asociado a la presencia del embrión que induce en el sistema materno de algunas especies una trombocitopenia pasajera que ocurre durante las primeras 24 horas posteriores a la fertilización. Aunque este factor no se ha purificado, sus características bioquímicas y fisiológicas son análogas al Factor Activador de Plaquetas (PAF). La evidencia reciente sugiere que el PAF tiene una función autocrina en la gestación temprana (Roberts *et al* , 1990; Gandolfi *et al* , 1992).

Hay factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento Transformador (TGF), el Factor de Crecimiento Parecido a la Insulina (IGF) y el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) que intervienen en el crecimiento y desarrollo de los embriones antes de su implantación y posteriormente son mediadores de la decidualización e implantación embrionaria (Gandolfi *et al* , 1992). Estos factores de crecimiento además de participar en el metabolismo del embrión contribuyen a la síntesis de proteínas embrionarias y estimulan el crecimiento y la diferenciación de las células uterinas (Gandolfi *et al* , 1992).

También los oviductos de la oveja y vaca secretan factores que tienen una importante actividad mitogénica sinérgica con la insulina y por tanto, con los IGF (Gandolfi *et al* , 1992).

Aunque esta comunicación inicial entre el útero y el embrión es importante, los eventos posteriores de reconocimiento de la gestación, en donde se encuentran involucradas las proteínas trofoblásticas producidas por los rumiantes, son los que determinan finalmente la viabilidad o muerte del embrión.

### RECONOCIMIENTO DE LA GESTACION EN LA OVEJA.

El reconocimiento materno de la gestación en la oveja ocurre alrededor de los días 12 a 13 del ciclo estral (Moor and Rowson, 1966; Roberts *et al*, 1989).

En ovejas no gestantes, alrededor de los días 12 a 15 del ciclo estral ocurre la destrucción del cuerpo lúteo (Stewart, *et al*, 1989) mediante la liberación pulsátil de PGF $2\alpha$ , la cual origina un decremento brusco de los niveles basales de P4 a menos de 0.2 ng/ml (Zarco *et al*, 1984, 1988a). Para que la gestación pueda mantenerse debe evitarse dicha liberación pulsátil de PGF $2\alpha$  (Flint *et al*, 1986; Thatcher *et al*, 1986) ya que es indispensable que continúe el aporte adecuado de P4 por parte del cuerpo lúteo (Stewart *et al*, 1989).

La producción de PGF $2\alpha$  se incrementa tanto en las ovejas gestantes como en las no gestantes, hasta alcanzar un pico alrededor del día 14 ó 15, para posteriormente decrecer. Sin embargo, el patrón de secreción es diferente, ya que en las ovejas no gestantes la secreción es pulsátil, mientras que en las ovejas gestantes hay una elevación constante de la secreción basal de PGF $2\alpha$ , pero sin pulsos marcados (Zarco *et al*, 1988b).

En la oveja, se requiere la secreción de sustancias embrionarias para que ocurra el reconocimiento materno de la gestación y el CL se mantenga más allá del día 14 postovulación, mediante tres mecanismos principales: la atenuación de la liberación pulsátil de la PGF $2\alpha$  por el útero, la reducción de la actividad luteolítica de la PGF $2\alpha$  sobre el cuerpo lúteo y el incremento en la secreción de PGE2 por parte del útero gestante (Wiepz *et al*, 1992; Wiltbank *et al*, 1992; Niswender *et al*, 1994).

Recientemente se ha aislado e identificado el factor antiluteolítico secretado por el embrión, el cual es una proteína trofoblástica, denominada anteriormente como proteína X, antiluteolisina trofoblástica o trofoblastina y actualmente en ovejas, proteína trofoblástica ovina-1 (oTP-1) (Godkin *et al.*, 1982, 1984a; Roberts *et al.*, 1989; Stewart *et al.*, 1989; Martal *et al.*, 1990).

Se han aislado proteínas trofoblásticas en las ovejas, las cabras y las vacas teniendo gran homología entre ellas (Gnatek *et al.*, 1989; Bazer *et al.*, 1991; Bazer, 1992).

La oTP-1 es el producto de secreción del embrión (y sus membranas extraembrionarias) más abundante entre los días 12 a 21 de la gestación. Aunque ya los embriones de 8 días de edad producen oTP-1 en cantidades apreciables (Ashworth and Bazer, 1989).

La oTP-1 es producida por el epitelio del trofoblasto (trofoectodermo) y absorbida por las células epiteliales de la superficie del lumen uterino (células carunculares e intercarunculares) y por el epitelio de las glándulas uterinas superiores (Godkin *et al.*, 1982, 1984a,b; Thatcher *et al.*, 1986; Bazer *et al.*, 1989).

El incremento en la producción de oTP-1 coincide con la transformación morfológica del embrión y con su crecimiento, ya que entre el día 4 y 10 el embrión mantiene una forma esférica y tiene un diámetro de tan sólo 0.4 a .14 mm, transformándose después a una forma tubular y posteriormente filamentososa, llegando el trofoblasto a medir entre 140 a 190 mm en el día 15 de la gestación (Thatcher *et al.*, 1986; Bazer *et al.*, 1991; Geisert *et al.*, 1992; Roberts *et al.*, 1992).

Existe un segundo periodo de producción de la oTP-1 por el corion fetal (cuyo origen es el trofoblasto embrionario) entre los días 25 a 45 de la gestación (Bazer *et al.*, 1991).

Aparentemente la oTP-1 no es secretada al torrente sanguíneo materno y sus receptores se encuentran en el endometrio uterino (Godkin *et al.*, 1984b; Stewart *et al.*, 1989), lo que sugiere una acción local. En este sentido, la infusión intrauterina tanto de oTP-1 pura como de oTP recombinante, prolonga la vida del cuerpo lúteo cuando es administrada a partir del día 10-12 del ciclo estral (Vallet *et al.*, 1988; Godkin *et al.*, 1984a; Martal *et al.*, 1990).



Para alargar la vida del cuerpo lúteo en ovejas también se han administrado en conjunto las proteínas secretadas por el embrión o bien interferones bovinos recombinantes, alrededor de los días en que ocurre el reconocimiento materno de la gestación (Vallet *et al* , 1988; Martinod *et al* , 1991; Parkinson *et al* , 1992).

La estructura primaria de la oTP-1 es similar en un 40 a 55 % a la de los inteferones alfa clase I, y en un 70 % idéntica al interferón bovino alfa clase II, ya que tiene el mismo número de aminoácidos (172) y una secuencia parecida (Roberts, 1989; Roberts *et al* , 1989, 1992). Las secuencias de DNA de la oTP-1 y la bTP-1 son idénticas en un 85 % (Roberts *et al* , 1990). Al ser la oTP-1 un interferón alfa presenta propiedades antivirales, siendo también regulador de la respuesta inmune materna y de la diferenciación celular (Roberts *et al* , 1989, 1990, 1992; Stewart *et al* , 1989).

La función principal de la oTP-1 es la de evitar el establecimiento del patrón de secreción luteolítico (pulsátil) de la PGF $2\alpha$  mediante el bloqueo directo de la síntesis de receptores para oxitocina (Bazer, 1992) o mediante la inhibición de la expresión de estos receptores o de su reciclamiento (Flint *et al* , 1992), ya que en apariencia no afecta las concentraciones de los receptores a oxitocina ya sintetizados -evaluado ésto mediante la administración de interferones bovinos recombinantes- (Stewart *et al* , 1989, 1992), ni compete con la oxitocina por los mismos receptores endometriales (Bazer *et al* , 1989, 1991).

Cualquiera de estos mecanismos origina que finalmente la oxitocina no pueda activar a la enzima sintetasa de prostaglandina (Salamonsen *et al* , 1991).

La oTP-1 puede bloquear también la síntesis de receptores para estrógenos o inhibir los efectos de los estrógenos y/o progesterona necesarios para la síntesis endometrial de receptores para oxitocina o inhibir directamente a la sintetasa de prostaglandina (Bazer *et al* , 1991).

Es probable que la oTP-1 induzca al endometrio a sintetizar un inhibidor de las enzimas (o de alguna enzima en particular) necesarias para la síntesis de la PGF $2\alpha$  como la fosfolipasa A2 o la cicloendoperoxidasa (Bazer *et al* , 1991; Geisert *et al* , 1992).

Se ha demostrado también que la administración de interferones alfa reduce las concentraciones de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos de las membranas, lo que sugiere que un efecto similar puede estar involucrado en el mecanismo de acción de la oTP-1 (Stewart *et al* , 1989).

Además de la oTP-1, se han aislado otras proteínas producidas por el embrión ovino cuya función es la de proteger al cuerpo lúteo bloqueando la acción de la PGF $2\alpha$  (luteoprotectoras), sin embargo, hasta el momento no han sido descritas detalladamente (Wiltbank *et al* , 1992).

Como un mecanismo adicional para lograr el reconocimiento materno de la gestación, algunos investigadores indican que la prostaglandina E2 (PGE2), que es producida por el útero gestante inhibe la acción de la PGF $2\alpha$  sobre el cuerpo lúteo, ya que la administración de PGE2 alarga la vida del cuerpo lúteo en ovejas, vacas y primates (Gimenez and Hendricks, 1983; Wiepz *et al* , 1992; Niswender *et al* , 1994). Aunque no se conoce el mecanismo de acción de las sustancias luteoprotectoras durante el reconocimiento materno de la gestación, se sabe que no es mediante la reducción del número de receptores a la PGF $2\alpha$  o por el aumento en los receptores a la PGE2 (Wiepz *et al* , 1992).

En vacas se ha sugerido que la atenuación de la secreción de PGF $2\alpha$  uterina durante la preñez temprana, es debida a la acción de un inhibidor proteínico intracelular denominado Inhibidor Endometrial de la Sintetasa de Prostaglandina (EPSI), que no es competitivo con respecto al ácido araquidónico. La formación del EPSI es inducida por la bTP-1 y parece ser que su mecanismo principal de acción es inhibiendo a la enzima ciclooxigenasa, fundamental en la síntesis de PGF $2\alpha$  (Thatcher *et al* , 1989).

## REQUERIMIENTOS DE SINCRONIA UTERO-EMBRION.

Al tener los eventos del reconocimiento de gestación una relación cronológica precisa, cualquier retraso o adelanto importante en el desarrollo embrionario o en el ambiente uterino materno, puede originar deficiencias en el reconocimiento de la preñez.

Por esta razón, la mayor sobrevivencia de los embriones que son transferidos se obtiene cuando tanto la donadora de los embriones como la receptora se encuentran en el mismo día del ciclo estral, es decir, cuando las receptoras presentan estro no más de 12 horas antes o 12 horas después que la donadora (Moore and Shelton, 1964; Rowson and Moor, 1966; Rowson *et al* , 1972; Wilmut *et al* , 1985, 1988).

Esta sincronía implica la existencia de la relación más adecuada entre el embrión transferido y el útero que lo recibe para su establecimiento y desarrollo, ya que al existir un complejo diálogo entre el embrión en desarrollo y el útero, una gestación exitosa depende de una serie de eventos cuidadosamente relacionados. Por ejemplo, las proteínas secretadas por el embrión junto con las prostaglandinas y los esteroides ováricos, principalmente la progesterona, actúan coordinadamente para modificar la bioquímica y la morfología uterina, por lo que una relación inadecuada entre estos factores o una asincronía puede originar la muerte del embrión (Maurer and Echemkamp, 1982; Albiñ *et al* , 1991; Asworth, 1992).

En la oveja se ha determinado que en aquellas gestaciones en las que ocurre muerte embrionaria, los perfiles plasmáticos de la progesterona durante las dos primeras semanas después de la monta o inseminación se encuentran alterados. En cambio, mientras más elevados están los valores de la progesterona hay mayores oportunidades de gestación (Wilmut *et al* , 1985; Asworth, 1992).

Es posible que existan varias causas de retraso en el desarrollo embrionario. Una de las más importantes en rumiantes es el estrés calórico, que resulta en alteraciones en el medio ambiente uterino que de alguna manera inhiben el desarrollo embrionario y retrasan la secreción de las proteínas trofoblásticas responsables del reconocimiento de la gestación (Putney *et al* , 1988).

También es posible que un retraso relativo en el desarrollo del embrión en relación al estado del ciclo estral de la madre, sea una de las principales causas de la mortalidad embrionaria que se presenta cuando se realizan transferencias de embriones en los que la donadora y la receptora no se encuentran en el mismo día del ciclo estral (Albiñ *et al* , 1991; Ashworth, 1992).

En la oveja existe evidencia directa de que la tasa de desarrollo del embrión puede ser alterada por el ambiente uterino. Estos efectos se han estudiado mediante la posterior colección de los embriones que han sido transferidos en asincronía, en donde se ha determinado claramente que aquellos embriones relativamente retrasados en su crecimiento al ser transferidos a un ambiente uterino adelantado, se desarrollan más rápido que aquellos transferidos a un ambiente sincrónico. En contraste, aquellos embriones adelantados en relación con el útero al que son transferidos, pueden retrasar su desarrollo (Wilmot and Sales, 1981; Lawson *et al* , 1983; Wilmot *et al* , 1988).

Sin embargo, los embriones demasiado asincrónicos, en relación con el ciclo estral de la receptora, no son capaces de compensar un ambiente uterino inadecuado, por lo que su crecimiento se vuelve anormal y no son capaces de inhibir la luteólisis, siendo finalmente expulsados del útero (Wilmot *et al* , 1985).

En las ovejas una relativa asincronía es bien tolerada, ya que se ha determinado que cuando existe una asincronía de hasta 48 horas entre el estro de la donadora y la receptora disminuye poco el porcentaje de fertilidad, en comparación con transferencias realizadas en sincronía (Moore and Shelton, 1964).

Igualmente, se ha demostrado que mientras más días de vida tenga el embrión al ser transferido, tolera mejor una asincronía de entre 24 a 48 horas, ya que embriones ovinos colectados a partir de las 72-84 horas hasta alrededor del día 9 postestro son gestados exitosamente, lo que no ocurre con embriones de menor edad (Moore and Shelton, 1964; Moor and Rowson, 1966; Rowson and Moor, 1966; Wilmot *et al* , 1988).

Sin embargo, cuando la asincronía entre la donadora y la receptora es de 72 horas o más, sólo un pequeño porcentaje de ovejas queda gestante (8 - 20 %), a pesar de haberles sido transferidos embriones colectados al día 5 a 7 postestro y cuyo estadio corresponde al de mórula o blastocito, respectivamente (Rowson and Moor, 1966; Wilmut and Sales, 1981).

Al igual que en la oveja, la transferencia de embriones en asincronía en la vaca origina que los porcentajes de fertilidad disminuyan conforme la asincronía se incrementa, aunque a diferencia de la oveja, una asincronía de 48 horas o más origina un decremento importante de los porcentajes de fertilidad. Por lo que se ha determinado que los requerimientos de sincronía son más precisos en la vaca que en la oveja (Rowson et al , 1972; Albiñ et al , 1991). Aunque de manera similar a la oveja, es posible el establecimiento de gestaciones cuando existen 72 horas de asincronía entre el estro de la donadora y la receptora; sobre todo cuando se transfieren embriones en un estadio más avanzado como el de blastocito temprano o blastocito expandido o cuando se administra progesterona durante los primeros días del ciclo estral. Al parecer, la administración temprana de progesterona a las receptoras puede modificar efectivamente el ambiente uterino, permitiendo sobre todo el establecimiento de gestaciones de embriones adelantados en su desarrollo. (Rowson et al , 1972; Kunkel and Stricklin, 1978; Geisert et al , 1991). En vacas se han obtenido gestaciones de embriones colectados al día 7 y cuyos estadios eran de mórula o blastocito, en transferencias realizadas con una asincronía de entre 2.5 a 7.5 días, mediante la administración de GnRH (Drost et al , 1989).

En ovejas a las que se les transfiere un embrión con 48 horas de asincronía, la administración temprana de progesterona modifica el ambiente uterino y la secreción de diferentes proteínas embrionarias, pero aparentemente estas proteínas no tienen efecto alguno sobre el desarrollo de los embriones transferidos (Ashworth and Bazer, 1989).

Existen dos posibles explicaciones de la pérdida embrionaria que ocurre cuando la donadora y la receptora no se encuentran en sincronía. Una de ellas sería la modificación fatal del desarrollo embrionario causada por la exposición a un ambiente uterino inadecuado, ya que el desarrollo del embrión es alterado en el útero de una receptora en asincronía. La otra posibilidad es que el embrión sea incapaz de ejercer su efecto antiluteolítico sobre el cuerpo lúteo de la receptora, con el resultado de que el cuerpo lúteo no es mantenido y la gestación perdida (Rowson and Moor, 1966; Wilmut *et al* , 1985).

### LIQUIDO FOLICULAR E INHIBINA.

El líquido folicular contiene diferentes componentes no esteroideos entre los que se incluyen a la inhibina, la folistatina y la activina, así como diferentes inhibidores como las proteínas ováricas inhibitorias, los inhibidores de la maduración de los ovocitos, los inhibidores de la luteinización y los inhibidores de la unión de la FSH a su receptor (Darga and Reichert, 1978; Sato *et al* , 1982; Henderson *et al* , 1986; De Jong, 1991; Knight, 1991a,b).

Hasta el momento, se han caracterizado más ampliamente la inhibina, la activina y la folistatina. En la hembra (de especies como ovinos, bovinos, equinos, porcinos, primates, roedores) la inhibina está presente en altas concentraciones en el líquido folicular, lo que sugiere que son los folículos su fuente principal. Recientemente se ha demostrado que son las células de la granulosa de los folículos antrales las que producen la inhibina (Findlay *et al* , 1986; Kretser and Robertson, 1989; Campbell *et al* , 1990; Roser *et al* , 1994), bajo el control de la hormona folículo estimulante (FSH) y mediante el mecanismo del adenosin 3', 5'-monofosfato cíclico (AMPC) (Kretser and Robertson, 1989; Campbell *et al* , 1990).

Aunque en humanos y en primates no humanos se ha demostrado que también el cuerpo lúteo, bajo el control de la LH produce inhibina (Davis *et al* , 1987; Tsonis *et al* , 1987; Fraser *et al* , 1989; Smith *et al* , 1991), en las ovejas no se ha encontrado la expresión de RNA para la subunidad alfa en células lúteas, lo que indica que las células que principalmente producen inhibina son las de la granulosa (Kretser and Robertson, 1989; Baird *et al* , 1991).

En el macho (de diferentes especies domésticas y en roedores y humanos) la inhibina es producida *in vivo* por las células de Sertoli y su producción controlada por la FSH (Tsonis *et al* , 1987; Kretser and Robertson, 1989; Lincoln and McNeilly, 1989; Tilbrook *et al* , 1991). *In vitro* las células de Leydig de ratas adultas también producen inhibina (Risbridger *et al* , 1989, citado por Clarke *et al* , 1991).

En la oveja tanto la FSH como la LH son necesarias para el desarrollo de folículos antrales grandes. La secreción de FSH está controlada por un mecanismo de retroalimentación negativa que ejercen dos hormonas ováricas, la inhibina y el estradiol (Martin *et al* , 1988; Mann *et al* , 1990, 1992b; Driancourt, 1990; Price, 1991).

La FSH estimula el crecimiento, la mitosis y la completa diferenciación de las células de la granulosa de los folículos preovulatorios grandes, para que adquieran receptores para LH y tengan su máxima actividad aromatizante (transformación de andrógenos a estrógenos mediante la enzima aromatasa) y produzcan cantidades importantes de inhibina (Henderson *et al* , 1984; Baird *et al* , 1991; McNeilly and Baird, 1991a). Cerca del 90% del estradiol secretado por los ovarios se deriva de estos folículos estimulados con FSH (Baird *et al* , 1991; Mann *et al* , 1992a).

La inhibina es secretada principalmente por los folículos antrales grandes, sin importar que todavía no adquieran su máxima capacidad aromatizante o que ya la hayan perdido (Tsonis *et al* , 1983; Baird *et al* , 1991). *In vitro* , se ha demostrado que el 55 % de la producción total de inhibina se debe a los folículos esteroideogénicos grandes. Sin embargo, los folículos grandes no esteroideogénicos y los folículos pequeños contribuyen con el 33 % y el 12 % de la producción de inhibina, respectivamente (Mann *et al* , 1992a).

La secreción de estradiol por los folículos preovulatorios depende de la existencia de precursores de andrógenos producidos por las células de la teca estimuladas por la LH. Al disminuir los niveles de progesterona al final de la fase lútea, el incremento en la secreción de LH estimula el progresivo incremento de la secreción de estradiol que ocurre durante la fase folicular (Baird *et al* , 1991). En esta etapa del ciclo estral existe un ligero e inconsistente incremento en la producción de inhibina relacionado con el aumento en el número de los

foliculos antrales grandes (Baird *et al* , 1991). Esto sugiere que la retroalimentación negativa sobre la FSH está controlada globalmente por la inhibina, al igual que el número total de los foliculos antrales grandes presentes en los ovarios; mientras que el estradiol influye en gran medida sobre las fluctuaciones diarias de las concentraciones de FSH (que a su vez determinan el número de foliculos ovulatorios), y sobre el número de aquellos foliculos destinados a ovular (Baird *et al* , 1991; Price, 1991; Taya *et al* , 1991).

La inhibina suprime específicamente la producción y la secreción hipofisiaria de la FSH, ya que la administración *in vivo* de sustancias que tienen actividad de inhibina disminuye la producción de RNAm para la subunidad beta de la FSH en la pituitaria y por tanto causa también el decremento de las concentraciones circulantes de FSH (De Jong, 1991; Findlay *et al* , 1991).

La inhibina es una hormona glicoproteica formada por dos subunidades diferentes unidas por disulfuro, denominadas alfa y beta (Burger, 1988) y al igual que otras hormonas su secreción es pulsátil (durante la fase folicular los pulsos de inhibina ocurren cada  $66 \pm 5$  min.) y sus pulsos coinciden con los pulsos de androstenediona que siguen a los pulsos de LH (McNeilly and Baird, 1989b; Findlay *et al* , 1991).

En general, se han aislado y caracterizado dos formas de inhibina denominadas A y B, y sus diferencias se deben a variaciones en la secuencia de los aminoácidos de la subunidad beta ya que la subunidad alfa es constante, pudiendo la inhibina estar formada por una subunidad alfa y una subunidad beta A o por una subunidad alfa y otra beta B, esto tanto en líquido folicular bovino como ovino y porcino (Kretser and Robertson, 1989; Knight, 1991a). La inhibina se ha caracterizado en el líquido folicular de especies como los bovinos, equinos, ovinos, caprinos, porcinos, roedores y primates (Hamada *et al* , 1989; Bergfelt *et al* , 1991; De Jong, 1991).

Existe una gran homología interespecie en la estructura primaria de las subunidades alfa y beta, para la subunidad alfa la homología es cercana al 85 % y del 95 al 100 % para la subunidad beta (Knight, 1991a).



Tanto la subunidad alfa como la subunidad beta son sintetizadas primeramente en una pre-pro forma y se ha determinado que aparentemente por separado, las subunidades que constituyen a la inhibina no son biológicamente activas (De Jong, 1991).

Se han identificado dos formas "libres o nativas" de la subunidad alfa (fragmento N y fragmento C) que unidas a una fracción "pro" constituyen la forma madura de la subunidad alfa; la subunidad alfa madura, se unirá posteriormente a la subunidad beta, de tal forma que la inhibina formada será biológicamente activa (Knight, 1991a).

La activina estimula la secreción de FSH y está compuesta por dos subunidades beta A de inhibina o por una beta A y la otra beta B. A la primera se le denomina activina y a la segunda activina A. Los efectos de la activina sobre la secreción hipofisiaria de FSH se encuentran antagonizados por la inhibina (Findlay et al , 1991; Knight, 1991a).

La folistatina también está relacionada con la actividad supresora que se ejerce contra la FSH pero no está formada con fragmentos de inhibina. La folistatina porcina y bovina suprimen específicamente la producción de FSH (la liberación y el contenido celular) aunque con una potencia mucho menor que la inhibina, por lo que se piensa que la inhibina y la folistatina comparten el mismo mecanismo de acción y que sus efectos son aditivos (Robertson et al , 1990; Findlay et al , 1991; Knight, 1991a).

Recientemente se ha encontrado una homología considerable entre las subunidades beta de la inhibina y otro tipo de proteínas implicadas en la diferenciación celular y en procesos de desarrollo como son el factor de crecimiento transformador beta, la sustancia inhibidora de los conductos de Müller, el factor de diferenciación eritroide y la activina. También se ha aislado RNAm para la inhibina en el cerebro y en la médula espinal, por lo que se piensa que pudiera tener un papel regulador en el sistema nervioso central. A estas proteínas se les ha agrupado dentro de la familia de "péptidos relacionados con la inhibina" (Kretser and Robertson, 1989; Knight, 1991a).

En vacas y ovejas se ha utilizado experimentalmente la administración de líquido folicular bovino, ovino o equino libre de esteroides para suprimir específicamente las concentraciones plasmáticas de la FSH, incrementar la tasa ovulatoria o retardar el inicio del estro (Henderson *et al* , 1986; Quirk and Fortune, 1986; Medhamurthy *et al* , 1987; Baird *et al* , 1990; McNeilly *et al* , 1991b); así como para adelantar la pubertad en ovejas hembras y machos inmaduros sexualmente, al inmunizarlos activamente con líquido folicular (Al-Obaidi *et al* , 1987). Los principales efectos del líquido folicular se han atribuido a la acción de su elevado contenido de inhibina (Knight *et al* , 1991b).

La supresión de las concentraciones plasmáticas de la FSH dependen de la dosis de líquido folicular administrado, ya que en ovejas la aplicación cada 8 o cada 12 horas, de cantidades de líquido folicular bovino menores a 1 ml no producen ningún efecto o su efecto es breve, mientras que la administración de 1 a 5 ml son efectivas para inhibir a niveles no detectables la FSH plasmática (Henderson *et al* , 1986; Martin *et al* , 1987).

En ovejas, la administración endovenosa de 3 ml de líquido folicular equino, permite el mantenimiento del cuerpo lúteo cuando se induce la ovulación en hembras anéstricas \* o retrasar el inicio del estro \*\*.

Las concentraciones de FSH se encuentran inhibidas mientras se mantiene la administración de líquido folicular y al suspenderse su aplicación dichas concentraciones se incrementan hasta tres veces, por lo que este efecto puede utilizarse en ovejas para incrementar la tasa ovulatoria, ya que la elevación en los niveles de FSH puede afectar la dinámica folicular y promover el desarrollo de un mayor número de folículos preovulatorios (McNeilly *et al* , 1989a; Vosniakou *et al* , 1991), mediante el incremento en la aromatización de andrógenos a estrógenos y de la secreción de estradiol (Wallace *et al* , 1985; Henderson *et al* , 1986; Medhamurthy *et al* , 1987; McNeilly *et al* , 1991a).

---

\* Balcázar *et al* , 1994, comunicación personal.

\*\* Hernández *et al* , 1994, comunicación personal.

Este efecto superovulatorio se puede lograr también mediante la inmunización contra la subunidad alfa de la inhibina, ya que al incrementarse los niveles de la FSH tanto el diámetro de los folículos como la tasa de ovulación de las hembras inmunizadas se incrementa (Forage *et al* , 1987; Findlay *et al* , 1989; Mann *et al* , 1989, 1990; McLeod *et al* , 1991), al igual que la tasa de parición (Boland *et al* , 1994).

Igualmente, la administración de líquido folicular durante el periodo preovulatorio previene la ovulación y retrasa el inicio del estro (Miller *et al* , 1979a; Henderson *et al* , 1986; Medhamurthy *et al* , 1987).

En las ovejas tratadas con líquido folicular bovino se reduce el desarrollo folicular (Wallace *et al* , 1988; Larson *et al* , 1991), ya que el mayor diámetro que alcanzan los folículos es de alrededor de 3 mm (Wallace *et al* , 1988) y en caso de existir folículos grandes (mayores o iguales a 5 mm de diámetro) tienen menores concentraciones de  $17 \beta$  estradiol, contienen una menor cantidad de células de la granulosa y su actividad para aromatizar testosterona a  $17 \beta$  estradiol se encuentra reducida (Henderson *et al* , 1986; Baird *et al* , 1990). Además, la producción de AMP cíclico (AMPC) por parte de estas células en respuesta al desafío con FSH o con LH es menor (Henderson *et al* , 1986).

Tanto la proliferación de las células de la granulosa como la biosíntesis de estradiol folicular y el desarrollo de la capacidad de respuesta de las células de la granulosa a la FSH o a la LH (medida a través de la producción de AMPC) son eventos dependientes de las concentraciones plasmáticas de la FSH. Por lo que la reducción o inhibición de la FSH afectará forzosamente estos eventos (Henderson *et al* , 1986). En yeguas se ha demostrado que la administración de líquido folicular equino también suprime las concentraciones de FSH circulante y en consecuencia, inhibe el crecimiento folicular y retrasa la ovulación (Miller *et al* , 1979b; Bergfelt and Ginther, 1985; Gremmes, 1990).

## MATERIAL Y METODOS

### Trabajo experimental

El presente trabajo se realizó en el Centro de Enseñanza Práctica, Investigación y Extensión en Rumiantes (CEPIER) y en el Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ).

El CEPIER está ubicado en el km 29 de la Carretera Federal México-Cuernavaca, Delegación Tlalpan, D.F, a 2760 msnm, 19° 3' latitud norte y 99° 8' longitud oeste. El clima de la región es de tipo c(w) (w)b (ij), que corresponde a semifrío-semihúmedo, con lluvias en verano y una precipitación pluvial de 800 a 1200 mm.

El trabajo experimental se realizó durante los meses de agosto de 1993 a enero de 1994, que corresponden al periodo de actividad reproductiva plena en el CEPIER (Quispe et al , 1994).

### Animales experimentales

Las ovejas empleadas eran de diferente número de parto y de razas Dorset, Pelibuey, Rambouillet y Suffolk, así como cruza entre éstas.

Los animales fueron mantenidos en estabulación y alimentados con heno de avena, ensilado de maíz y concentrado.

Todas las ovejas se encontraban ciclando, lo cual se verificó antes del experimento mediante la detección de calores una vez al día utilizando un macho cubierto con un mandil.

### Transferencia de embriones

En el experimento se utilizaron un total de 48 ovejas, de las cuales 17 fueron donadoras de embriones y 31 receptoras. Las receptoras se asignaron aleatoriamente a tres grupos. El primer grupo quedó integrado por 11 ovejas en asincronía a las que se les administró líquido folicular equino (grupo asincrónico/lfe). Al segundo grupo se asignaron 11 hembras en asincronía que no recibieron líquido folicular (grupo asincrónico). El tercer grupo se formó con 9 ovejas, las que se encontraban en sincronía en relación con el ciclo estral de las hembras donadoras (grupo sincrónico). Para la conformación de los grupos se manipuló el ciclo estral de las ovejas mediante la colocación de esponjas intravaginales impregnadas con 40 mg de acetato de fluorogestona, las que se retiraron a los 12 días en las donadoras y en las receptoras del grupo sincrónico, mientras que en las receptoras en asincronía se retiraron a los 9 días, con el objeto de que las ovejas de estos grupos en asincronía iniciaran el ciclo estral con un adelanto de 3 días con respecto a las donadoras. En todas las hembras sincronizadas se aplicaron 15 mg de prostaglandina F<sub>2</sub> α dos días antes del retiro de la esponja (Hafez, 1993).

Las donadoras fueron superovuladas con 15 mg de hormona folículo estimulante (FSH-P) en dosis decreciente, mediante el siguiente esquema: dos días antes de retirar la esponja se administraron 4 mg en la mañana y 3 mg en la tarde, al día siguiente 2 mg en la mañana y 2 mg en la tarde, y el día del retiro de las esponjas se administraron 2 mg en la mañana y 2 mg en la tarde (Cognie et al., 1985).

Tanto en las donadoras como en las receptoras la detección de calores se realizó dos veces al día (mañana y noche), utilizando carneros enteros provistos de un mandil con el objeto de registrar el momento del inicio del estro (día 0 del ciclo sincronizado en las receptoras). Como receptoras se ocuparon únicamente aquellas ovejas que presentaron estro conductual a las 48 horas del retiro de la esponja.

Todas las donadoras utilizadas fueron servidas en la mañana del segundo día posterior al retiro de la esponja, considerándose este día de la primera monta como el día 0, a pesar de haber sido detectadas en celo la noche del día anterior (a las 36 horas del retiro de la esponja).

Las ovejas fueron servidas por monta natural con machos previamente evaluados, que permanecieron con las donadoras mientras éstas continuaran en celo, montándolas en repetidas ocasiones.

Los embriones fueron obtenidos en el día 6 de la gestación mediante laparotomía media ventral. Para ello se exteriorizó el útero y se observaron los ovarios con el fin de determinar la respuesta a la superovulación. Posteriormente ambos cuernos uterinos fueron lavados por separado. En la base de cada cuerno uterino se introdujo una sonda de Foley de calibre 8 G y mediante la infusión de aproximadamente 60 ml de solución de Dulbecco modificada a la que se le agregó un 4 % de albúmina sérica bovina más penicilina G sódica (100 UI/ml) se colectaron los embriones (Schiewe *et al*, 1984; Ruttle *et al*, 1988; Stefani *et al*, 1990).

Los embriones se evaluaron al microscopio estereoscópico para seleccionar únicamente aquellos clasificados morfológicamente como buenos o excelentes (esféricos, simétricos y con células de tamaño, color y textura uniformes o con imperfecciones menores en estas características) (Trejo, 1986; Ruttle *et al*, 1988).

A cada receptora se le transfirieron en fresco dos embriones en estadio de mórula o blastocito. Para la transferencia de dichos embriones se utilizó la técnica laparoscópica descrita por Flores-Foxworth *et al*, 1992, en donde mediante el laparoscopio se localizó el ovario con el cuerpo lúteo más desarrollado y en el cuerno ipsilateral se realizó la transferencia, mediante una pequeña punción.

### **Administración de líquido folicular y toma de muestras**

A las receptoras del grupo asincrónico/lfe se les administró por vía endovenosa 3.0 ml de líquido folicular equino (LFE) libre de esteroides, cada 8 horas durante 12 días a partir del día de la transferencia embrionaria.

A las receptoras de todos los grupos se les tomaron diariamente muestras de sangre para la determinación de la progesterona (P4) plasmática durante 12 días a partir del día 9 del ciclo estral sincronizado.

Posteriormente fueron muestreadas una vez a la semana durante seis semanas, para el seguimiento de la gestación o la verificación de la caída de los niveles de progesterona por abajo de 1 ng/ml, indicadora de no gestación (Flores *et al*, 1992).

Las muestras fueron obtenidas por punción yugular utilizando tubos heparinizados al vacío e inmediatamente centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos. El plasma fue congelado en alícuotas a -20 grados centígrados hasta la realización del radioinmunoanálisis (RIA).

### **Determinación de progesterona por radioinmunoanálisis.**

Para la determinación de los valores plasmáticos de P4 se utilizó RIA en fase sólida (Srikandakamur *et al*, 1986), el coeficiente de variación intraensayo para el control bajo ( $2.59 \pm 0.205$  ng/ml) fue de 7.90% y para el control alto ( $16.42 \pm 0.537$  ng/ml) de 3.27%. El coeficiente de variación interensayo fue de 7.77% y 9.76% respectivamente. La sensibilidad mínima del ensayo fue de 0.094 ng/ml.

### **Diagnóstico de gestación**

Para el diagnóstico de gestación se consideraron los niveles de la P4 detectada en la muestra obtenida de cada oveja al día 19 posterior al estro. Los valores mayores a 1 ng/ml se consideraron como indicadores de gestación (Flores *et al*, 1992).

Este diagnóstico se confirmó mediante ultrasonografía de tiempo real en el día 60 posterior al estro (Bretzlaff *et al*, 1993).

### **Obtención y procesamiento del líquido folicular equino**

El líquido folicular equino utilizado se obtuvo con jeringas estériles, a partir de folículos ováricos de yeguas sacrificadas en un rastro local.

El líquido folicular se obtuvo inmediatamente después del sacrificio y se depositó en frascos con tapón de rosca, mantenidos en hielo para su posterior transporte al laboratorio, en donde inicialmente se mezcló todo el líquido recolectado y se sometió a una primera centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos a 4° C con la finalidad de eliminar los detritus celulares (Lussier, 1989).

Posteriormente con el objeto de remover las hormonas esteroides presentes en el fluido se le añadió carbón activado (10 mg/ml) más dextran (0.1 mg/ml) y se agitó durante 1 hora a 25°C. El carbón activado más dextran se retiró mediante seis centrifugaciones a 3000 rpm durante 30 minutos a 4°C, cada una.

Finalmente se agregó penicilina G sódica (100 UI/ml) para evitar la contaminación microbiana. El líquido folicular equino se mantuvo a -20° centígrados hasta su utilización (Lussier, 1989).

Las concentraciones de esteroides (progesterona y estradiol) presentes en el líquido folicular equino ya preparado fueron determinadas mediante radioinmunoanálisis, encontrándose niveles de progesterona no detectables y niveles de estradiol no mayores a 300 pg/ml.



## **Análisis estadísticos**

Los porcentajes de fertilidad entre los tres grupos o tratamientos fueron comparados mediante la prueba exacta de Fisher (Navarro, 1988).

Se calcularon las medias mínimo cuadráticas de los valores diarios de la progesterona plasmática (P4) entre los grupos asincrónico/ife y asincrónico a partir de un análisis de varianza multifactorial para mediciones repetidas; que consideró como variables independientes el día del ciclo estral, el estado gestacional y el tratamiento, así como el efecto del animal anidado dentro de la interacción tratamiento por estado gestacional (Littell et al., 1992), mediante el procedimiento GLM (modelo lineal general) del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, 1991). Para comparar los días en que se produjeron diferencias significativas en los valores de P4 entre grupos o estados gestacionales, se utilizó la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples (Neter and Wasserman, 1974).

Se compararon también las medias mínimo cuadráticas de los valores diarios de la progesterona plasmática de las ovejas gestantes entre los grupos asincrónico/ife, asincrónico y sincrónico, a partir de un análisis de varianza de tres factores para mediciones repetidas; que consideró como variables independientes el día del ciclo y el tratamiento, así como el efecto del animal anidado dentro del tratamiento (SAS GLM).

Para los análisis estadísticos se consideraron los valores diarios de la P4 obtenidos del día 9 al día 20 posterior al estro.

Se comparó la duración de la fase lútea (medida del día 4 posterior al estro al día en que cayeron los valores de P4 por debajo de 1 ng/ml) entre las ovejas no gestantes de los grupos asincrónico/ife y asincrónico, mediante la prueba de t (SAS TTEST). La fase lútea se consideró normal si su duración fue de entre 11 a 13 días y alargada (luteólisis retrasada) si su duración fue mayor.

Finalmente, se comparó la prolificidad de las ovejas paridas de los tres grupos mediante la prueba de t (SAS TTEST).

## RESULTADOS

En el cuadro 1 se muestran los porcentajes de fertilidad por grupo, así como el de todas las ovejas en asincronía (tratadas y no tratadas con líquido folicular equino) y total (ovejas en asincronía y sincronía). Aunque el porcentaje de fertilidad es aparentemente mayor en las ovejas del grupo en sincronía, no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos.

Cuadro 1. Comparación de los porcentajes de fertilidad en ovejas que recibieron embriones en forma sincrónica, y en ovejas a las que se les transfirieron embriones asincrónicos y que recibieron o no líquido folicular equino.

Grupo	Gestantes	No Gestantes	Porcentaje de Fertilidad
ASINCRONICAS CON LFE	4	7	36.36 a
ASINCRONICAS SIN LFE	7	4	63.63 a
SINCRONICAS	7	2	77.77 a
ASINCRONICAS (c y s/lfe)	11	11	50.00
TOTAL	18	13	58.06

a, valores con la misma literal no son estadísticamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

En la Figura 1 se muestran las concentraciones de progesterona en diferentes días postestro en las ovejas del grupo sincrónico que quedaron gestantes. Aunque las concentraciones fluctúan marcadamente entre animales y entre días, en todos los animales las concentraciones se mantienen por encima de 2 ng/ml durante todo el muestreo. En la Figura 2 se observa que en aquellas ovejas que logran reconocer y establecer la gestación a pesar de haber recibido embriones asincrónicos, las concentraciones de progesterona son similares a las del grupo sincrónico, con amplias variaciones individuales y entre días, pero manteniéndose siempre por arriba de 2 ng/ml.

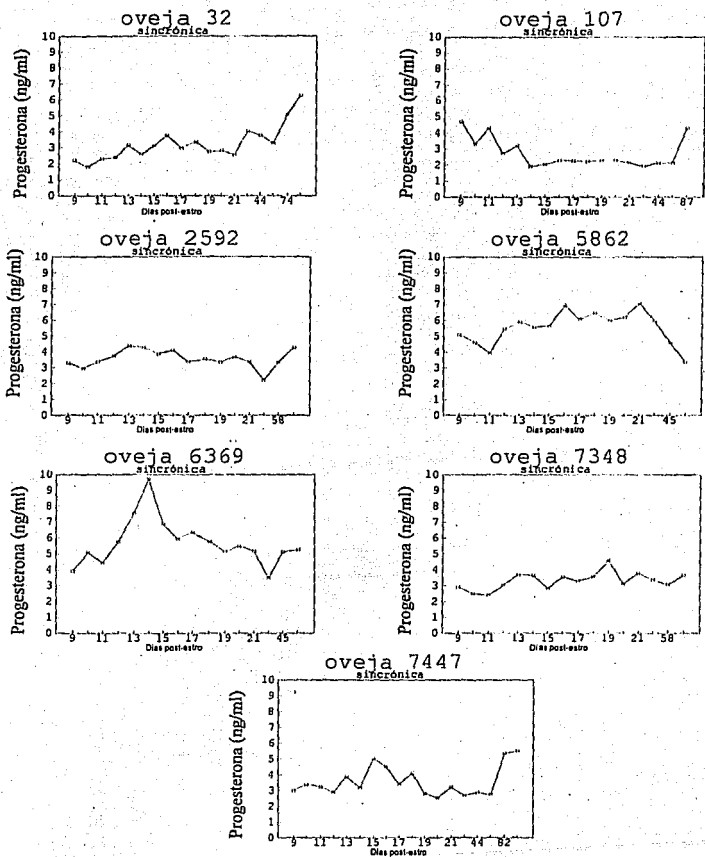


Figura 1. Concentraciones de progesterona en diferentes días postestro en 7 ovejas que quedaron gestantes después de transferirles embriones sincrónicos (de 6 días de edad) en el día 6 postestro. Nótese que los sangrados solamente son continuos hasta el día 21, después del cual sólo se muestran valores en días aislados.

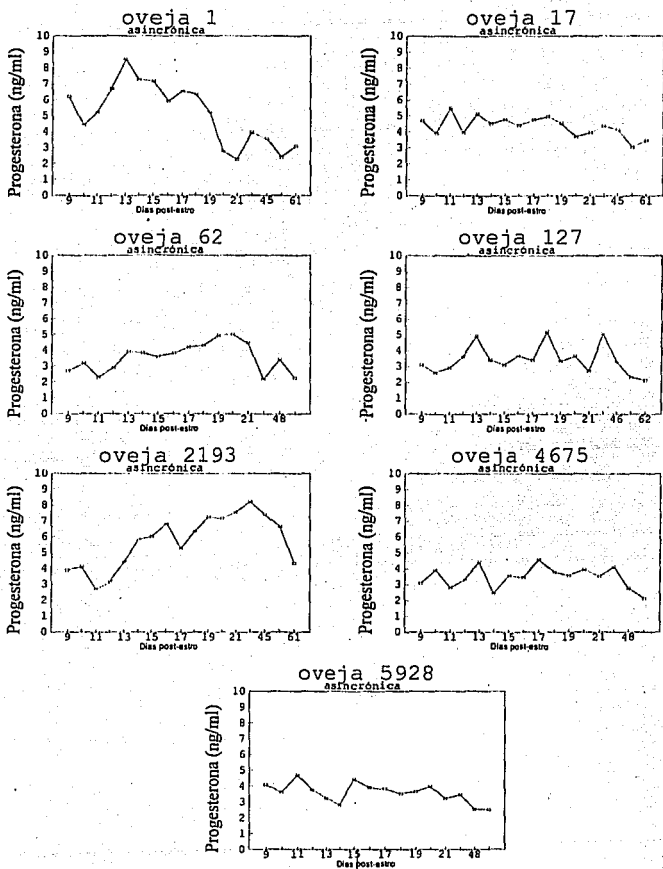


Figura 2. Concentraciones de progesterona en diferentes días postestro en 7 ovejas que quedaron gestantes después de transferirles embriones asincrónicos (de 6 días de edad) en el día 9 postestro. Los sangrados solamente son continuos hasta el día 21, después del cual sólo se muestran valores en días aislados.

En la figura 3 se muestran las concentraciones de progesterona de las ovejas que quedaron gestantes después de transferirles embriones en forma asincrónica y tratarlas con líquido folicular equino. Al igual que en los otros grupos se observan amplias fluctuaciones tanto entre días como entre individuos. Sin embargo, en todos los casos las concentraciones se mantienen por encima de 2 ng/ml durante todos los días del muestreo.

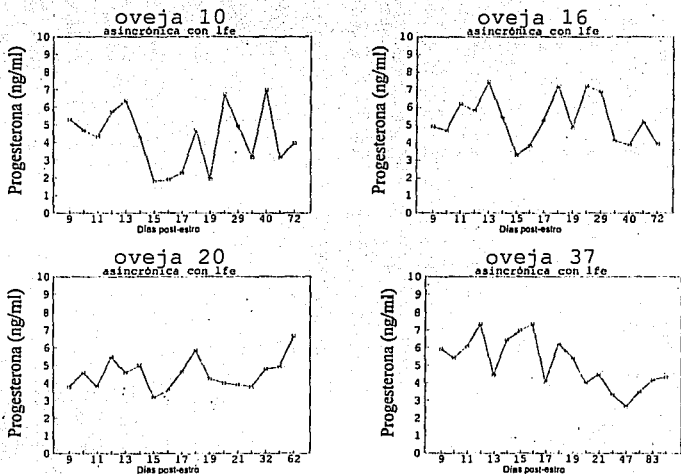


Figura 3. Concentraciones de progesterona en diferentes días postestro en 4 ovejas que quedaron gestantes después de transferirles embriones asincrónicos (de 6 días de edad) en el día 9 postestro y ser tratadas con líquido folicular equino cada 8 horas entre el día 9 y 20. Nótese que los sangrados solamente son continuos hasta el día 21 postestro, después de los cuales sólo se muestran valores en días aislados.

En el cuadro 2 se muestran las medias mínimo cuadráticas de los valores diarios de progesterona plasmática (P4) de las ovejas que quedaron gestantes en los grupos sincrónico, asincrónico, y asincrónico tratado con líquido folicular equino. Entre el día 9 y el día 12, las concentraciones de progesterona en las ovejas gestantes del grupo asincrónico tratado con LFE fueron significativamente mayores que las de las ovejas gestantes del grupo sincrónico ( $P < 0.05$ ).

Esta tendencia se mantuvo durante el resto de los días muestreados, aunque la diferencia solamente volvió a ser significativa en el día 18. Las concentraciones de progesterona de las ovejas gestantes del grupo asincrónico que no fue tratado con líquido folicular se mantuvieron intermedias en relación a los otros grupos, sin ser significativamente diferentes a ninguno de ellos.

Cuadro 2. Concentraciones de progesterona (ng/ml) en diferentes días postestro en ovejas que quedaron gestantes después de transferirles embriones sincrónicos o embriones asincrónicos y tratarlas o no con líquido folicular equino (LFE).

Día ciclo	SINCRONICAS	ASINCRONICAS	
	n:7	SIN LFE n:7	CON LFE n:4
	Media ± E.E.	Media ± E.E.	Media ± E.E.
9	3.17 ± 0.39 a	3.97 ± 0.36 a,b	4.97 ± 0.48 b
10	3.37 ± 0.36 a	3.67 ± 0.36 a,b	4.85 ± 0.48 b
11	3.41 ± 0.36 a	3.72 ± 0.36 a,b	5.10 ± 0.48 b
12	3.71 ± 0.36 a	3.91 ± 0.36 a,b	6.10 ± 0.56 b
13	4.53 ± 0.36 a	4.94 ± 0.36 a	5.71 ± 0.48 a
14	4.43 ± 0.39 a	4.29 ± 0.36 a	5.29 ± 0.48 a
15	4.19 ± 0.36 a	4.66 ± 0.36 a	3.83 ± 0.48 a
16	4.43 ± 0.36 a	4.57 ± 0.39 a	4.16 ± 0.48 a
17	3.96 ± 0.36 a	4.64 ± 0.36 a	4.06 ± 0.48 a
18	4.14 ± 0.36 a	4.91 ± 0.36 a,b	6.00 ± 0.48 b
19	3.84 ± 0.36 a	4.64 ± 0.36 a	4.11 ± 0.48 a
20	3.74 ± 0.36 a	4.31 ± 0.36 a,b	5.48 ± 0.48 b

a, b para un determinado día (renglón), los valores que no comparten por lo menos una literal son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

En la figura 4 se muestran las concentraciones de progesterona en una oveja del grupo sincrónico que no quedó gestante después de la transferencia de embriones. Como puede observarse, las concentraciones de progesterona se mantienen por arriba de 2 ng/ml desde el día 9 hasta el día 13, descendiendo a menos de 1 ng/ml en el día 14 del ciclo, lo que indica una luteólisis normal.

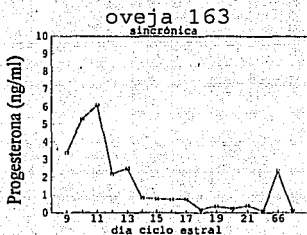


Figura 4. Concentraciones de progesterona en diferentes días postestro en 1 oveja que no quedó gestante después de transferirle embriones sincrónicos (de 6 días de edad) en el día 6 postestro. Nótese que los sangrados solamente son continuos hasta el día 21, después del cual sólo se muestran valores en días aislados.

En la figura 5 se muestran las concentraciones de progesterona en las cuatro ovejas del grupo asincrónico que no quedaron gestantes. En todos los animales las concentraciones de progesterona se mantuvieron por arriba de 2 ng/ml hasta el día 14 ó 15 del ciclo estral, reduciéndose a menos de 1 ng/ml en el día 15 ó 16 del ciclo, lo que indica la ocurrencia de luteólisis normal en todos los animales no gestantes del grupo asincrónico (cuadro 3).

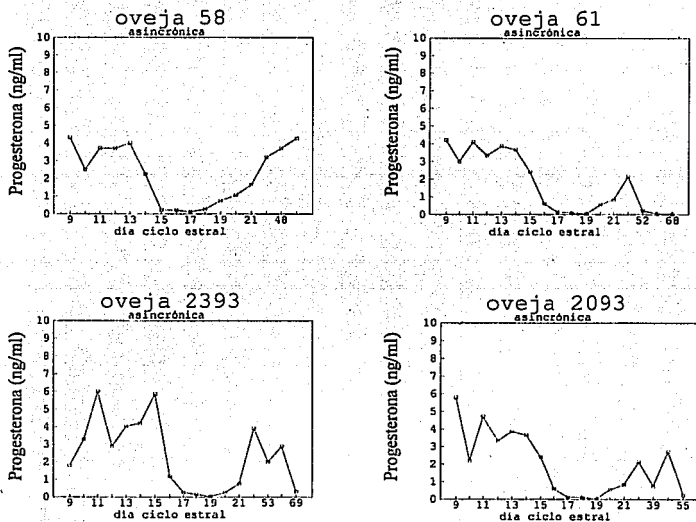


Figura 5. Concentraciones de progesterona en diferentes días postestro en 4 ovejas que no quedaron gestantes después de transferirles embriones asincrónicos (de 6 días de edad) en el día 9 postestro. Los sangrados solamente son continuos hasta el día 21, después del cual sólo se muestran valores en días aislados.



En los animales que no quedaron gestantes en el grupo asincrónico tratado con LFE se presentaron dos tipos diferentes de comportamiento lúteo. En cuatro de los animales se presentó luteólisis en forma normal, reduciéndose las concentraciones de progesterona a menos de 1 ng/ml en el día 16 ó 17 del ciclo estral (Figura 6). En los otros tres animales de este grupo se produjo un retraso en la regresión del cuerpo lúteo, manteniéndose en todas ellas la producción de progesterona hasta por lo menos el día 21 postestro (Figura 7).

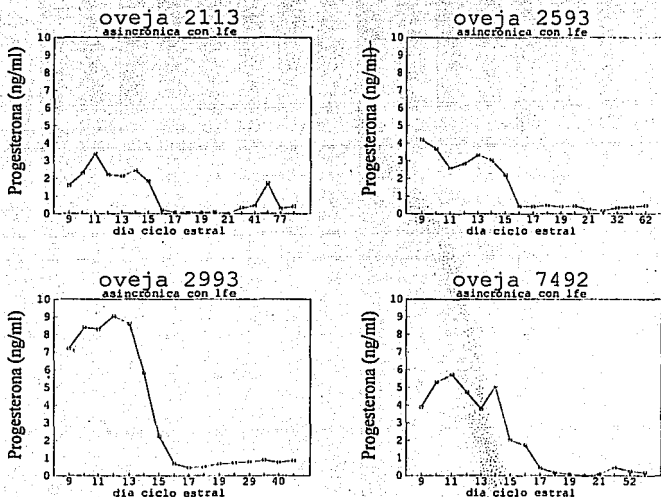


Figura 6. Concentraciones de progesterona en diferentes días postestro en 4 ovejas que no quedaron gestantes y presentaron luteólisis normal después de transferirles embriones asincrónicos ( de 6 días de edad ) en el día 9 postestro y tratarlas con líquido folicular equino entre el día 9 y el 20. Nótese que los sangrados solamente son continuos hasta el día 21 postestro, después del cual sólo se muestran valores en días aislados.

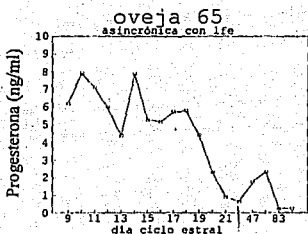
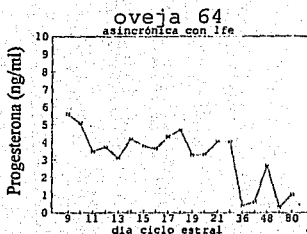
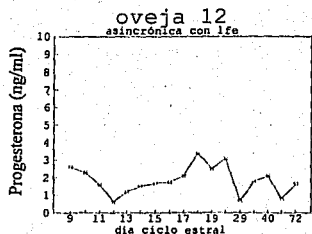


Figura 7. Concentraciones de progesterona en diferentes días postestro en 3 ovejas que no quedaron gestantes y presentaron luteólisis retrasada después de transferirles embriones asincrónicos ( de 6 días de edad) en el día 9 postestro y tratarlas con liquido folicular equino entre el día 9 y el 20. Los sangrados solamente son continuos hasta el día 21 postestro, después del cual sólo se muestran valores en días aislados.

En el cuadro 3 se resume el tipo de regresión lútea de las ovejas que no quedaron gestantes en los grupos asincrónicos tratados o no con líquido folicular equino (ASINLFE y ASIN). También se muestra la duración promedio de las fases lúteas en ambos grupos. Aunque las diferencias no son significativas debido al reducido número de animales, solamente en el grupo que fue tratado con LFE se presentaron casos de luteólisis retrasada, por lo que en promedio la luteólisis en este grupo ocurrió 2.8 días después que en el grupo que no fue tratado con LFE.

Cuadro 3. Clasificación de las ovejas no gestantes de los grupos asincrónicos de acuerdo al momento en que ocurrió la luteólisis y duración promedio de la fase lútea en cada grupo.

Ovejas en asincronía	N	Luteólisis		Duración de la fase lútea (días)		
		Normal	Retrasada	Mínimo	Máximo	Media $\pm$ D.E.
SIN LFE	4	4 (100%)	0	11	13	12.00 $\pm$ 0.81 a
CON LFE	7	4 (57%)	3 (43%)	12	21	14.85 $\pm$ 3.53 a

a, valores con la misma literal no son estadísticamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

En el cuadro 4 se muestran las medias mínimo cuadráticas de los valores diarios de la progesterona plasmática (P4) de las hembras no gestantes de los grupos asincrónicos tratados o no con LFE. No se incluyeron las medias de las ovejas gestantes del grupo en sincronía, ya que solamente se cuenta con los valores de un animal, por lo que no pueden considerarse como representativos. Los valores de la P4 fueron casi siempre mayores en las ovejas tratadas con LFE, aunque las diferencias solamente fueron significativas en los días 10 y 18 postestro.

Cuadro 4. Concentraciones de progesterona (ng/ml) en diferentes días postestro en ovejas no gestantes de los grupos en asincronía tratados o no con LFE.

Día postestro	Asincrónicas sin LFE Media ± E.E	Asincrónicas con LFE Media ± E.E.
9	4.02 ± 0.61 a	4.47 ± 0.46 a
10	2.75 ± 0.61 a	5.00 ± 0.46 b
11	4.85 ± 0.71 a	4.60 ± 0.46 a
12	3.32 ± 0.61 a	4.16 ± 0.46 a
13	3.94 ± 0.61 a	3.79 ± 0.46 a
14	3.45 ± 0.61 a	4.27 ± 0.46 a
15	2.72 ± 0.61 a	2.72 ± 0.46 a
16	0.65 ± 0.61 a	1.94 ± 0.46 a
17	0.16 ± 0.61 a	1.92 ± 0.46 a
18	0.16 ± 0.61 a	2.16 ± 0.46 b
19	0.21 ± 0.61 a	1.63 ± 0.46 a
20	0.61 ± 0.61 a	1.42 ± 0.46 a

a,b, para un determinado día los valores con distinta literal son estadísticamente diferentes (p<0.05).

En el cuadro 5 se muestra la prolificidad de las ovejas que quedaron gestantes en cada uno de los grupos. El número de corderos por gestación fue más elevado en el grupo sincrónico que en los grupos asincrónicos. Sin embargo, solamente existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos Asincrónico con LFE y Sincrónico.

Cuadro 5. Número de corderos por gestación en las ovejas transferidas en sincronía o en asincronía.

Grupo	Prolificidad $\pm$ D.E.
Sincrónico	1.71 $\pm$ 0.50 b
Asincrónico con LFE	1.25 $\pm$ 0.49 a
Asincrónico sin LFE	1.28 $\pm$ 0.49 ab
Promedio	1.44 $\pm$ 0.50

a,b valores con la misma literal no son estadísticamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

## DISCUSION

En el presente trabajo se encontró que la administración de líquido folicular equino provocó el alargamiento de la fase lútea en algunas de las hembras que no quedaron gestantes (figura 7). Esto confirma los resultados de trabajos previos en los que la administración de líquido folicular equino ha logrado mantener el cuerpo lúteo en las ovejas inducidas a ovular durante la época de anestro\* o retrasar el inicio del estro tanto en yeguas (Bergfelt and Ginter, 1985; Gremmes, 1990) como en ovejas\*\*.

A pesar de lo anterior, el porcentaje de fertilidad de las ovejas en asincronía tratadas con líquido folicular equino fue menor que en los otros grupos, lo que indicaría que el alargar la fase lútea con el objeto de favorecer el reconocimiento de la gestación no es suficiente para lograr el establecimiento de los embriones asincrónicos. Esto es apoyado por los resultados de Odensvik y Gustafsson (1994), quienes encontraron que en vacas a las que se les transfirió un embrión con 3 días de asincronía, la administración de flunixin meglumine, potente inhibidor de la síntesis de  $PGF2\alpha$ , retrasa la luteólisis y prolonga la vida del cuerpo lúteo. Aunque se permite el desarrollo y la sobrevivencia temporal de los embriones asincrónicos, éstos no tienen la capacidad para implantarse con éxito, por lo que puede pensarse que cuando los embriones son depositados en un útero asincrónico sufren un daño irreversible.

Existen dos posibles mecanismos que explicarían la pérdida embrionaria que ocurre cuando se transfieren embriones a receptoras que se encuentran en asincronía.

El primero implica que el embrión se pierda al no poder evitar a tiempo los eventos fisiológicos que originan la luteólisis, en este caso, se esperaría que el alargamiento de la fase lútea producido por el líquido folicular equino permitiría el reconocimiento de la gestación, lo que no se observó en este trabajo.

---

\* Balcázar et al, 1994, comunicación personal.

\*\* Hernández et al, 1994, comunicación personal.

El segundo mecanismo consistiría en que el embrión al encontrarse en un ambiente uterino inadecuado ocasionado por la asincronía, sea afectado fatalmente en su desarrollo y muera a pesar de mantenerse el cuerpo lúteo.

Existen evidencias de que este segundo mecanismo es importante, ya que el ambiente uterino de asincronía puede causar en forma inmediata alteraciones en el desarrollo embrionario. Así, en ovejas receptoras que se encuentran en el día 1 ó 2 postestro y que se les mantiene el cuerpo lúteo mediante hemihisterectomía, cuando se les transfieren embriones de 4 días de edad y se colectan posteriormente, éstos aparecen retrasados en su desarrollo, siendo incapaces de superar el estadio de blastocito temprano (Lawson et al, 1983). En cambio, embriones de 4 días de edad transferidos a receptoras hemihisterectomizadas que se encuentran en el día 6 ó 7 postestro, presentan un desarrollo acelerado que se mantiene hasta que el útero alcanza el día 12 de la gestación, lo que significa que el útero produce señales que tratan de estimular al embrión asincrónico para que logre sincronizarse con el útero.

Sin embargo, a pesar de que el desarrollo acelerado parece ser un mecanismo para compensar la diferencia de edad entre el embrión y el útero, la mayoría de los embriones mueren posteriormente, indicando que ese desarrollo acelerado no es normal, aún cuando algunos de ellos son capaces de continuar creciendo hasta la cuarta semana de gestación, siempre y cuando el cuerpo lúteo se mantenga mediante la hemihisterectomía (Lawson et al , 1983). Por el contrario, cuando el cuerpo lúteo no es mantenido mediante hemihisterectomía, la mayoría de los embriones se pierden al ser destruidos cuando ocurre la regresión del cuerpo lúteo, siendo probablemente expulsados del útero al iniciar el siguiente estro (Lawson et al , 1983). Lo anterior indica que en algunos casos el mantenimiento del cuerpo lúteo puede ayudar en la continuación de la gestación, pero que en otros casos el daño inicial sufrido por el embrión al ser transferido en asincronía es irreversible.

Las causas por las que mueren los embriones transferidos asincrónicamente son complejas y difíciles de explicar. Por ejemplo, cuando se transfieren embriones de 3 ó 6 días de edad a una primer receptora con 3 días de asincronía (día 6 ó 9 postestro) y se colectan tres días después, dichos embriones son aparentemente viables (Wilmut and Sales, 1981). Sin embargo, la mayoría (86%) de los embriones de 6 días de edad transferidos a una primer receptora que se encuentra en el día 9 postestro, pierden la capacidad de llegar a término al ser nuevamente transferidos a una segunda receptora que también se encuentra en el día 9 (en sincronía con la donadora original), lo que indicaría que durante los tres días en que el embrión se encuentra en un útero asincrónico se produce un daño que morfológicamente no es visible, pero que daña irreversiblemente al embrión. En cambio, un porcentaje importante (70 %) de los embriones de 3 días de edad transferidos a una primer receptora que se encuentra en el día 6 postestro y que son posteriormente transferidos a una segunda receptora en el día 6 (en sincronía con la donadora original) llegan a término, lo que sugiere que los embriones de 3 días de edad son más resistentes al daño producido por una asincronía temporal en comparación con los embriones de 6 días de edad (Wilmut and Sales, 1981). Por lo que al parecer, el ambiente uterino asincrónico afecta el desarrollo embrionario de diferente manera dependiendo de la edad del embrión.

En el presente trabajo se encontró que las ovejas a las que se les transfirieron embriones en sincronía tuvieron mejor fertilidad y mayor prolificidad que aquellas que recibieron embriones en asincronía, hayan sido tratadas o no con líquido folicular equino (cuadros 1 y 5). Sin embargo, las diferencias no fueron significativas, lo que se debe a que el porcentaje de hembras que quedaron gestantes en los grupos asincrónicos (50 %) fue muy superior al esperado, ya que de acuerdo a la literatura cuando se transfieren embriones de 3 ó 6 días de edad a receptoras con 72 horas de asincronía los porcentajes de fertilidad son sumamente bajos.

Así, Rowson y Moor (1966) obtuvieron un 8 % de fertilidad al transferir embriones de 5 días de edad a receptoras que se encontraban en el día 2 o en el día 8 postestro, mientras que Wilmut y Sales (1981) transfirieron embriones de 3 ó 6 días de edad a receptoras que se encontraban en el día 6 ó 9 postestro (con 3 días de asincronía) y ninguno llegó a término.



No es posible determinar con certeza la causa de el alto porcentaje de fertilidad obtenido en el presente estudio en los grupos asincrónicos. Aunque en diversos trabajos se ha demostrado que a pesar de existir una relación de asincronía entre el útero y el embrión, es posible obtener un porcentaje importante de gestaciones en las ovejas cuando la asincronía no es mayor de 48 horas (Rowson and Moor, 1966; Ashworth and Bazer, 1989), en cambio, cuando la asincronía es de 72 horas como en este trabajo, el desarrollo y la sobrevivencia embrionaria se verían afectados.

El hecho de haber transferido dos embriones a cada receptora no puede explicar los altos porcentajes de fertilidad obtenidos en el presente trabajo en las ovejas asincrónicas, ya que tanto en los experimentos de Ashworth y Bazer (1989) y Odensvik y Gustafsson (1994) en los que solamente se transfirió un embrión por receptora, como en los de Moore y Shelton (1964); Rowson y Moor (1966) y Albiñ et al (1991), en donde se transfirieron dos embriones por receptora, la fertilidad de los grupos en asincronía fue mucho menor que el de las receptoras sincrónicas.

Otra posibilidad es que los altos niveles de progesterona encontrados en las receptoras en asincronía que quedaron gestantes, hayan estimulado que el desarrollo de los embriones se acelerara y compensara su menor edad en relación al útero en que se transfirieron. A este respecto debe señalarse que las concentraciones de progesterona en las hembras gestantes de los grupos en asincronía fueron generalmente mayores que las de las hembras gestantes del grupo en sincronía (cuadro 2). Por lo que pudiera pensarse que un embrión asincrónico transferido por azar a una hembra con niveles altos de progesterona podría tener una mayor probabilidad de sobrevivir.

En este sentido, Ashworth y Bazer (1989) demostraron que la administración de progesterona a hembras receptoras estimula la síntesis de proteínas embrionarias que son diferentes a las sintetizadas por los embriones de las receptoras que no reciben progesterona. Además Geisert et al (1991) determinaron que la administración de progesterona a hembras receptoras provoca una aceleración del desarrollo embrionario y en el caso del bovino, la administración de progesterona

a hembras transferidas en asincronía eleva los porcentajes de fertilidad hasta niveles cercanos a los logrados en las hembras en sincronía.

En este trabajo, la prolificidad fue superior en las ovejas que se encontraban en sincronía, lo que indica que aún cuando llegue a establecerse la gestación, existe la mayor pérdida embrionaria (muerte de uno de los dos embriones transferidos) cuando éstos son transferidos a un ambiente uterino inadecuado. Esto se ha demostrado en ovejas con anterioridad, ya que al transferir un embrión con una asincronía de 72 horas acompañado de un embrión en sincronía únicamente los embriones sincrónicos son gestados a término (Wilmot and Sales, 1981; Lawson et al. 1983; Wilmot et al. 1988), por lo que al parecer, el reconocimiento materno de la gestación es llevado a cabo por los embriones que se encuentran en sincronía y los embriones en asincronía mueren al encontrarse en un ambiente uterino desfavorable.

El tamaño de la muestra en este experimento se planeó para poder detectar diferencias similares a las informadas en la literatura, entre hembras a las que se les transfirieron embriones en sincronía o en asincronía. Sin embargo, al aumentar la fertilidad de las ovejas asincrónicas se redujo la diferencia entre los grupos, por lo que hubiera sido necesario aumentar el tamaño de la muestra, lo cual no pudo hacerse debido al alto costo de este tipo de investigación.

Dentro de las causas que contribuyeron a que las ovejas en asincronía que recibieron líquido folicular equino tuvieran el menor porcentaje de fertilidad, se podría considerar al estrés que implica el manejo de los animales gestantes para la administración del líquido folicular.

De la misma manera, habría que considerar que el alto porcentaje de fertilidad obtenido en las ovejas a las que les fueron transferidos embriones en asincronía puede deberse, al menos en parte, a los progresos que se tienen actualmente en cuanto a la técnica de la transferencia de embriones y al manejo de los mismos.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo no pudo demostrarse que el retrasar la luteólisis mediante la administración de líquido folicular equino (LFE) permite el reconocimiento de la gestación en las ovejas receptoras de embriones con 3 días de asincronía, debido a que un importante número de ellas quedó gestante, con o sin la administración de LFE.

El menor porcentaje de fertilidad y la mayor mortalidad embrionaria (expresada por una menor prolificidad), que ocurrió en las ovejas en asincronía, confirma que los requerimientos de sincronía entre el útero y el embrión son condición primordial para el establecimiento exitoso de la gestación cuando se realizan transferencias de embriones.

## LITERATURA CITADA

- Albinh, A., Gustafsson, H. and Rodriguez-Martínez, H. Maternal influence on the early development of asynchronously transferred bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* **24**: 25-35. (1991).
- Al-Obaidi, S.A.R., Bindon, B.M., Hillard, M.A. and O'Shea T. Reproductive characteristics of lambs active immunized early in life with inhibin-enriched preparations from follicular fluid of cows. *J. Reprod. Fert.* **81**: 403-414. (1987).
- Ashworth, C.J. and Bazer, F.W. Changes in ovine conceptus and endometrial function following asynchronous embryo transfer or administration of progesterone. *Biol. Reprod.* **40**: 425-433. (1989).
- Ashworth, C. J.: Synchrony embryo-uterus. *Anim. Reprod. Sci.* **28**: 259-267. (1992).
- Baird, D.T., Campbell, B.K. and McNeilly, A.S. Ovine follicular fluid suppresses the ovarian secretion of androgens, oestradiol and inhibin. *J. Endocr.* **127**: 23-32. (1990).
- Baird, D.T, Campbell, B.K., Mann, G.E. and McNeilly, A.S. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **43**: 125-138. (1991).
- Balcázar, S. J. Efecto de la suplementación alimenticia sobre la eficiencia reproductiva de corderas pelibuey inducidas a la pubertad con acetato de melengestrol. *Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.* (1992).
- Barcikowski, B., Carlson, J.C., Wilson, L. and McCracken. The effect of endogenous and exogenous estradiol-17 $\beta$  on the release of prostaglandin F $2\alpha$  from the ovine uterus. *Endocrinology*, **95**: 1340-1349. (1974).
- Bazer, F.W., Vallet, J.L., Harney, J.P., Gross, T.S. and Thatcher, W.W. Comparative aspects of maternal recognition of pregnancy between sheep and pigs. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **37**: 85-89. (1989).
- Bazer, F.W., Thatcher, W.W., Hansen, P.J., Mirando, M.A., Ott, T.L. and Plante, C. Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **43**: 39-47. (1991).
- Bazer, F.W. Mediators of maternal recognition of pregnancy in mammals. *Society for Experimental Biology and Medicine*, **199**: 373-384. (1992).
- Beard, A.P. and Lamming, G.E. Oestradiol concentration and the development of the uterine oxytocin receptor and oxytocin-induced PGF $2\alpha$  release in ewes. *J. Reprod. Fert.* **100**: 469-475. (1994).

Bergfelt, D.R. and Ginther, O.J. Delayed follicular development and ovulation following inhibition of FSH with equine follicular fluid in the mare. *Theriogenology*, **24**: 99-108. (1985).

Bergfelt, D.R., Mann, B.G., Schwartz, N.B. and Ginther, O.J. Circulating concentrations of immunoreactive inhibin and FSH during the estrous cycle of mares. *J. Equine Vet. Sci.* **11**: 319-322. (1991).

Braden, T.D., King, M.F., Odde, K.G. and Niswender, G.D. Functional and morphologic characteristics of the first corpus luteum formed after parturition in ewes. *J. Reprod. Fert.* **86**: 525-533. (1989).

Bretzlaff, K., Edwards, J., Forrest, D. and Nuti, L. Ultrasonographic determination of pregnancy in small ruminants. *Veterinary Medicine*, January, 12-24. (1993).

Boland, M.P., Sunderland, S.J., Williams, D.H., Kane, M., Headon, D.R. and Roche, J.F. Effect of immunisation of ewes against alpha 1-26 inhibin fragment on antibody titres, ovulation and lambing rate. *Animal Reproduction Science*, **34**: 241-251. (1994).

Burger, H.G. Inhibin: definition and nomenclature, including related substances. *J. Endocr.* **117**: 150-160. (1988).

Campbell, B.K., Mann, G.E., McNeilly, A.S. and Baird, D.T. Pulsatile secretion of inhibin, oestradiol and androstenedione by the ovary of the sheep during the oestrous cycle. *J. Endocr.* **126**: 385-393. (1990).

Clarke, I.J., Tilbrook, A.J., Galloway, D.B., Earl, C.R., Findlay, J.K. and de Kretser, D.M. Inhibin in rams. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **43**: 163-170. (1991).

Cognie, Y., Chupin, D. and Saumande, J. Comparison of FSH treatment schedules to induce superovulation in ewes. *Theriogenology*, **23**: 185. (1985).

Cooper, D.A., Carver, D.A., Villeneuve, P., Silvia, W.J. and Inskeep, E.K. Effects of progesterone treatment on concentrations of prostaglandins and oxytocin in plasma from the posterior vena cava of post-partum beef cows. *J. Reprod. Fert.* **91**: 411-421. (1991).

Cooke, R.G. and Homeida, A.M. Prevention of the luteolytic action of oxytocin in the goat by inhibition of prostaglandin synthesis. *Theriogenology*, **20**: 363-365. (1983).

Copelin J.P., Smith, M.F., Keisler, D.H. and Garverick, H.A. Effect of active immunization of prepartum and post-partum cows against prostaglandin F<sub>2α</sub> on lifespan and progesterone secretion of short-lived corpora lutea. *J. Reprod. Fert.* **87**: 199-207. (1989).

Darga, N.C. and Reichert, J.R. Some properties of the interaction of follicle stimulating hormone with bovine granulosa cells and its inhibition by follicular fluid. Biol. Reprod. **19**: 235-241. (1978).

Davis, S.R., Krosowski, Z., McLahian, R.I. and Burger H.G. Inhibin gene expression in the human corpus luteum. J. Endocr. **115**: R21-R23. (1987).

De Jong, F.H. Inhibin- Its nature, site of production and function. Oxford Reviews of Reproductive Biology **9**: 2-53. (1987).

Driancourt, M.A., Bodin, L., Boomarov, O., Thimonier, J. and Elsen, J.M. Number of mature follicles ovulating after a challenge of Human Chorionic Gonadotropin in different breeds of sheep at different physiological stages. J. Anim. Sci. **68**: 719-724. (1990).

Drost, M., Tan, H.S., MacMillan, K.L. and Thatcher, W.W. Successful asynchronous embryo transfer in cattle. Theriogenology **31**: 186. (1989).

Findlay, J.K., Tsonis, C.G., Staples, L.D. and Cahill, N.P. Inhibin secretion by the sheep ovary. J. Reprod. Fert. **76**: 751-761. (1986).

Findlay, J.K., Doughton, B., Robertson, D.M. and Forage, R.G. Effects of immunization against recombinant bovine inhibin alpha subunit on circulating concentrations of gonadotrophins in ewes. J. Endocr. **120**: 59-65. (1989).

Findlay, J.K., Clarke, I.J., Luck, M.R., Rodgers and R.J. Peripheral and intragonadal actions of inhibin-related peptides. J. Reprod. Fert. Suppl. **43**: 139-150. (1991).

Flint, A.P.F. and Sheldrick, E.L. Evidence for a systemic role for ovarian oxytocin in luteal regression in sheep. J. Reprod. Fert. **67**: 215-225. (1983).

Flint, A.P.F., Sheldrick, E.L., Theodosis, D.T. and Wooding, F.B.P. Ovarian peptides: role of luteal oxytocin in the control of the estrous cyclicity in ruminants. J. Anim. Sci. Suppl. **62**: 62-71. (1986).

Flint, A.P.F., Parkinson, T.J., Stewart, H.J., Vallet, J.L. and Lamming, G.E. Molecular biology of trophoblast interferons and studies of their effects in vivo. J. Reprod. Fert. Suppl. **43**: 13-25. (1991).

Flint, A.P.F., Stewart, H.J., Lamming, G.E. and Payne, J.H. Role of the oxytocin receptor in the choice between cyclicity and gestation in ruminants. J. Reprod. Fert. Suppl. **45**: 53-58. (1992).

Flores-Foxworth, G., Foxworth, B., and Nuti, L. Embryo Transfer in Kenian Goats. Proceedings of a workshop on Embryo Transfer held on 14th June 1991 at Sam Holiday In, Naivasha, Kenya (1992).

Flores, G., Amezcua, R., Zarco, L., Ducoing, A. and Quispe, Q. Pregnancy diagnosis by progesterone determination on day 18 post-service in the ewe. Proceedings 12th International Congress on Animal Reproduction The Hague. 45-47. (1992).

Forage, R.G., Brown, R.W., Oliver, K.J., Atrache, B.T., Devine, P.L., Hudson, G.C., Goss, N.H., Bertram, K.C., Tolstoshev, F., Robertson, D.M., Kretser, D.M., Doughton, B., Burger, H.G. and Findlay, J.K. Immunization against an inhibin subunit produced by recombinant DNA techniques results in increased ovulation rate in sheep. J. Endocr. 114: R1-R4. (1987).

Fraser, H.M., Robertson, D.M. and De Kretser, D.M. Immunoreactive inhibin concentrations in throught the menstrual cycle of the macaque: suppression of inhibin during the luteal phase after the treatment with an LHRH antagonist. J. Endocr. 121: R9-R12. (1989).

Gandolfi, F., Brevini, T. A. L., Modena, A. and Passoni, L. Early embryonic signals: embryo-maternal interactions before implantation. Anim. Reprod. Sci. 28: 269-276. (1992).

Garverick, H.A., Zollers, Jr. W.G. and Smith, M.F. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal fuction. Anim. Reprod. Sci. 28: 111-124. (1992a).

Garverick, H.A., Moser, M.T., Kiesler, D.H., Hamilton, S.A., Roberts, R.M. and Smith, M.F. Luteal function after intrauterine infusion of recombinant bovine interferon alpha 1 into postpartum beef cows expected to have short or normal luteal phases. J. Reprod. Fert. 94: 319-325. (1992b).

Geisert, D.R., Fox, C.T., Morgan, L.G., Wells, E.M., Wettemann, P.R., and Zavy, T.M. Survival of bovine embryos transferred to progesterone-treated asynchronous recipients. J. Reprod. Fert. 92: 475-482. (1991).

Geisert, D.R., Short, C.E. and Zavy, T.M. Maternal recognition of pregnancy. Anim. Reprod. Sci. 28: 287-298. (1992).

Gilbert, D.E., Conrood, S.A., Whiting, C.J. and Pashen, R.L. Comparison of a progesterone intravaginal device (CIDR) with flunixin meglumine (FINADYNE) for reducing the effects of corpora lutea regression in the goat. Theriogenology, 33: 230. (1990).

Gimenez, T., Henricks, D.M. Prolongation of the luteal phase by prostaglandin E2 during the estrus cycle in the cow. A preliminary report. Theriogenology, 19: 693-700. (1983).

Gnatek, G.G., Smith, L.D., Duby, R.T. and Godkin, J.D. Maternal recognition of pregnancy in the goat: effects of conceptus removal on interestrus intervals and characterization of protein production during early pregnancy. Biol. Reprod. 41: 655-663. (1989).

Godkin, J.D., Bazer, F.W., Moffatt, J., Sessions, F. and Roberts, R.M. Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocyst at day 13-21. *J. Reprod. Fert.*, **65**: 141-150. (1982).

Godkin, J.D., Bazer, F.W., Thatcher, W.W. and Roberts, R.M. Proteins released by cultured Day 15-16 conceptuses prolong luteal maintenance when introduced into the uterine lumen of cyclic ewes. *J. Reprod. Fert.*, **71**: 57-64. (1984a).

Godkin, J.D., Bazer, F.W. and Roberts, R.M. Ovine trophoblast protein 1, an early secreted blastocyst protein, binds specifically to uterine endometrium and affects protein synthesis. *Endocrinology*, **114**: 120-130. (1984b).

Gremmes, S. Sekretionsmuster der Gonadotropine nach hormoneller intervention bei der stute. *Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany.* (1990).

Grootenhuys, A.J., Steenberger, J. and de Jong, F.H. Inhibin and activin-like activity in fluids from male and female gonads: different molecular weight forms and bioactivity/immunoactivity ratios. *J. Endocr.*, **122**: 293-301. (1989).

Hafez, E.S.E. Reproduction in Farm Animals. *Lea and Febiger, 6th edition, USA.* (1993).

Hamada, T., Watanabe, G., Kokuho, T., Taya, K., Sasamoto, S., Hasegawa, W., Miyamoto, K. and Igarashi, M. Radioimmunoassay of inhibin in various mammals. *J. Endocr.*, **122**: 697-704. (1989).

Hansel, W., Alila, H.W., Dowd, J.P. and Milvac, R.A. Differential origin and control mechanisms in small and large bovine luteal cells. *J. Reprod. Fert.*, **43**: 77-89. (1991).

Henderson, K.M., Franchimont, P., Charlet-Renard, Ch. and McNatty, K.P. Effect of follicular atresia on inhibin production by bovine granulosa cells in vitro and inhibin concentrations in the follicular fluid. *J. Reprod. Fert.*, **72**: 1-8. (1984).

Henderson, K.M., Prisk, M.D., Hudson, N., Ball, K., McNatty, K.P., Lun, S., Heath, D., Kieboom, L.E. and McDiarmid, J. Use of bovine follicular fluid to increase ovulation rate or prevent ovulation in sheep. *J. Reprod. Fert.*, **76**: 623-635. (1986).

Hixon, J.E. and Flint, P.F. Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterin oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin F-2a secretion in sheep. *J. Reprod. Fert.*, **79**: 457-467. (1987).

Horton, E.W. and Poyser, N.L. Uterine luteolytic hormone: A physiological role for prostaglandin F2a. *Physiological Reviews* **56**: 595-650. (1976).



Hunter M.G., Ayad, V.J., Gilbert, C.L., Southce, J.A. and Wathes, D.C. Role of prostaglandin F2 $\alpha$  and oxytocin in the regression of GnRH-induced abnormal corpora lutea in anestrus ewes. J. Reprod. Fert., **85**: 551-556. (1989).

Hunter, M.G. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. J. Reprod. Fert. Suppl., **43**: 91-99. (1991).

Kindahl, H., Lindell, O. and Edqvist, L.E. Release of prostaglandin F2 $\alpha$  during the oestrous cycle. Acta Vet. Scand. Suppl., **77**: 143-158. (1981).

Kindahl, H. Maternal recognition of pregnancy in ruminants: an "on-off mechanism" of prostaglandin release. Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, 586-589. (1994).

Knight, P.G. Identification and purification of inhibin and inhibin-related proteins. J. Reprod. Fert. Suppl., **43**: 111-123. (1991a).

Knight, P.G., Wrathall, J.H.M., Glencross, R.G. and McLeod, B.J. Effects of bovine follicular fluid on the secretion of LH and FSH in inhibin-immunized seasonally anovulatory ewes. J. Endocr. **128**: 403-410. (1991b).

Kretser, D.M. and Robertson, D.M. The isolation and physiology of inhibin and related proteins. Biol. Reprod., **40**: 33-47. (1989).

Kunkel, R.N. and Stricklin, R. Donor-recipient asynchrony, stage of embryo development and the post-transfer survival of bovine embryos. Theriogenology, **9**: 96. (1978).

Lamming, J.L., Vallet, J.L. and Flint, A.P.F. Progesterone control of endometrial oxytocin receptor determines cycle length in sheep. J. Reprod. Fert. Suppl., **43**: 53-54. (1991).

Lamsa, J., Kot, S., Eldering, J., Nay, M. and McCracken, J. Prostaglandin F2 $\alpha$ -stimulated release of ovarian oxytocin in the sheep in vivo: threshold and dose dependency. Biol. Reprod., **40**: 1215-1223. (1989).

Larson, G., Mallory, D.S., Dailey, R.A. and Lewis, P.E. Gonadotropin concentrations, follicular development, and luteal function in pituitary stalk-transected ewes treated with bovine follicular fluid. J. Anim. Sci., **69**: 4104-4111. (1991).

Lau, T.M., Gow, C.B. and Fairclough, R.J. Increases in the oxytocin-induced prostaglandin F2 $\alpha$  response and reduction in the concentrations of endometrial oxytocin receptors in ewes in response to progesterone. J. Reprod. Fert., **95**: 11-18. (1992).

Lau, T.M., Kerton, D.J., Gow, C.B. and Fairclough, R.J. Role of progesterone in the control of endometrial oxytocin receptors at luteolysis in sheep. J. Reprod. Fert., **98**: 229-233. (1993).

Lawson, R.A.S., Parr, R.A. and Cahill, L.P. Evidence for maternal control of blastocyst growth after asynchronous transfer of embryos to the uterus of the ewe. J. Reprod. Fert. **67**: 477-483. (1983).

Lincoln, G.A. and McNeilly, A.S. Inhibin concentrations in the peripheral blood of rams during a cycle in testicular activity induced by changes in photoperiod or treatment with melatonin. J. Endocr. **120**: R9-R13. (1989).

Littel, R.C., Freund, R.J. and Spector, P.C. SAS System for linear models. Third Edition. SAS Institute Inc, N.C., USA. (1992).

Lussier, J.G. Modulation of ovarian follicular development in cattle by gonadotropins and bovine follicular fluid. Thesis for the Degree of Doctor Philosophy in the Department of Veterinary Physiological Sciences. University of Saskatchewan. (1989).

Mann, G.E., Campbell, B.K., McNeilly, A.S. and Baird, D.T. Passively immunizing ewes against inhibin during the luteal phase of the oestrous cycle raises the plasma concentration of FSH. J. Endocr. **123**: 383-391. (1989).

Mann, G.E., Campbell, B.K., McNeilly, A.S. and Baird, D.T. Effects of passively immunizing ewes against inhibin and oestradiol during the follicular phase of the oestrous cycle. J. Endocr. **125**: 417-424. (1990).

Mann, G.E., McNeilly, A.S. and Baird, D.T. Hormone production in vivo and in vitro from follicles at different stages of the oestrous cycle in the sheep. J. Endocr. **132**: 225-234. (1992a).

Mann, G.E., Campbell, B.K., McNeilly, A.S. and Baird, D.T. The role of inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. J. Endocr. **133**: 381-391. (1992b).

Martal, J., Degryse, E., Charpigny, G., Assal, N., Reinaud, P., Charlier, M., Gaye, P. and Lecocq, J.P. Evidence for extended maintenance of the corpus luteum by uterine infusion of a recombinant trophoblast alpha interferon (trophoblastin) in sheep. J. Endocr. **127**: R5-R8. (1990).

Martin, G.B., Taylor, P.L. and McNeilly, A.S. Effect of small doses of bovine follicular fluid on the tonic secretion of gonadotrophins in the ewe. J. Endocr. **114**: 73-79. (1987).

Martin, G.B., Price, C.A., Thiéry, J.C. and Webb, R. Interactions between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotrophin secretion in the ewe. J. Reprod. Fert. **82**: 319-328. (1988).

Martinod, S., Maurer, R.R., Siegenthaler, B., Gerber, C. and Hansen, P.J. The effects of recombinant bovine interferon-alpha on fertility in ewes. Theriogenology, **36**: 231-239. (1991).

- Maurer, R.R. and Echterkamp, S.E. Hormonal asynchrony and embryonic development. Theriogenology, **17**: 11-22. (1982).
- McCracken, J.A., Baird, D.T. and Goding, J.R. Factors affecting the secretion of steroids from the transplanted ovary in the sheep. Rec. Prog. Horm. Res., **27**: 537-542. (1971).
- McCracken, J.A., Schramm, W. and Oculicz, W.C. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF<sub>2a</sub> from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. Anim. Reprod. Sci., **7**: 31-55. (1984).
- McLeod, B.J., Haresing, W. and Lamming, G.E. Response of seasonally anoestrous ewes to small-dose multiple injection of GnRH without progesterone pre-treatment. J. Reprod. Fertil., **65**: 223-230. (1982a).
- McLeod, B.J., Haresing, W. and Lamming, G.E. The induction of ovulation and luteal function in seasonally anoestrous ewes treated with small-dose multiple injection of GnRH. J. Reprod. Fertil., **65**: 215-221. (1982b).
- McLeod, B.J., Hunter, M.G., Bleach, E.C., Glencross, R.G. and Wrathall, J.H.M. Preovulatory follicle development and luteal function in ewes immunized against a synthetic peptide sequence of bovine inhibin. J. Reprod. Fert. Suppl., **43**: 171-173. (1991).
- McNeilly, A.S., Swanston, I.A., Crow, W., Tsonis, C.G. and Baird D.T. Changes in the plasma concentrations of inhibin throughout the normal sheep oestrous cycle and after the infusion of FSH. J. Endocr., **120**: 295-305. (1989a).
- McNeilly, A.S. and Baird, D.T. Episodic secretion of inhibin into the ovarian vein during the follicular phase of the oestrous cycle in the ewe. J. Endocr., **122**: 287-292. (1989b).
- McNeilly, A.S., Picton, H.S., Campbell, B.K. and Baird, D.T. Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. J. Reprod. Fert. Suppl., **43**: 177-186. (1991a).
- McNeilly, A.S., Crow, W. and Campbell, B.K. Effect of follicular fluid and inhibin immunoneutralization on FSH-induced preovulatory follicle growth in the ewe. J. Endocr., **131**: 401-409. (1991b).
- Medhamurthy, R., Carruthers, T.D. and Manns, J.G. Effects of bovine follicular fluid inhibin on serum gonadotrophin concentrations in ewes during oestrous. J. Reprod. Fert., **81**: 91-98. (1987).
- Miller, K.F., Critser, J.K., Rowe, R.F. and Ginther, O.J. Ovarian effects of bovine follicular fluid treatment in sheep and cattle. Biol. Reprod., **21**: 537-544. (1979a).
- Miller, K.F., Wesson, J.A. and Ginther, O.J. Changes in concentrations of circulating gonadotropins following administration of equine follicular fluid to ovariectomized mares. Biol. Reprod., **21**: 867-872. (1979b).

- Moor, R.M. and Rowson, L.E.A. The corpus luteum of the sheep: functional relationship between the embryo and the corpus luteum. J. Endocr., **34**: 233-239. (1966).
- Moore, N.W. and Shelton, J.N. Egg transfer in sheep. J. Reprod. Fert., **7**: 145-152. (1964).
- Moore, L.G., Choy, V.J., Elliot, R.L. and Watkins, W.B. Evidence for pulsatile release of ovarian oxytocin during luteolysis in the ewe. J. Reprod. Fert., **76**: 159-166. (1986).
- Navarro Fierro, R. Introducción a la Bioestadística. Análisis de Variables Binarias. Ed. Mc Gray Hill. (1988).
- Neter, J. and Wasserman, W. Applied Linear Statistical Models. Richard D. Irwin, Inc. (1974).
- Newton, G.R., Plante, C., Hansen, P.J. and Thatcher, W.W. Effects of recombinant bovine interferon  $\alpha$ -1 (IFN) on maternal thermoregulation and embryonic development in vitro. J. Anim. Sci. Suppl., **67**: 369. (1989).
- Niswender, G.D., Juengel, J.L., McGuire, W.J., Belfiore, C.J. and Wiltbank, M.C. Luteal function: the estrus cycle and early pregnancy. Biol. Reprod., **50**: 239-247. (1994).
- Odensvik, K. and Gustafsson, H. Effect of flunixin during asynchronous embryo transfer in the heifer. Anim. Reprod. Sci., **36**: 13-24. (1994).
- Oldham, C. M. and Martin, G. B. Stimulation of seasonally anovular Merino ewes by rams. II. Premature regression of ram induced corpora lutea. Anim. Reprod. Sci., **1**: 291-295. (1979).
- O'Shea, J. D., Rodgers, R. J. and Wright, P. J. Morphometric analysis and function *in vivo* and *in vitro* of corpora lutea from ewes treated with LHRH during seasonal anestrus. J. Reprod. Fert., **72**: 75-85. (1984).
- Ott, T.L., Mirando, M.A., Davis, M.A. and Bazer, F.W. Effects of ovine conceptus secretory proteins and progesterone on oxytocin-stimulated endometrial production of prostaglandin and turnover of inositol phosphate in ovariectomized ewes. J. Reprod. Fert., **25**: 19-29. (1992).
- Parkinson, T.J., Lamming, G.E., Flint, A.P.F. and Jenner, L.J. Administration of recombinant bovine interferon alpha 1 at the time of maternal recognition of pregnancy inhibits prostaglandin F2 alpha secretion and causes luteal maintenance in cyclic ewes. J. Reprod. Fert., **94**: 489-500. (1992).
- Peter, A.T., Bosu, W.T., Liptrap, R.M. and Cumming, E. Temporal changes in serum prostaglandin F2 $\alpha$  and oxytocin in dairy cows with short luteal phases after the first post-partum ovulation. Theriogenology, **32**: 277-284. (1989).

- Price, C.A. The control of FSH secretion in the larger domestic species. J. Endocr. **131**: 177-184. (1991).
- Putney, D. J., Malayer, J. R., Gross, T. S., Thatcher, W. W., Hansen, P. J. and Drost, M. Heat stress-induced alterations in the synthesis and secretion of proteins and prostaglandins by cultured bovine conceptuses and uterine endometrium. Biol. Reprod. **39**: 717-728. (1988).
- Quirk, S.M. and Fortune, J.E. Plasma concentrations of gonadotrophins, preovulatory follicular development and luteal function associated with bovine follicular fluid-induced delay of oestrus in heifers. J. Reprod. Fert. **76**: 609-621. (1986).
- Quispe, T., Zarco, L., Valencia, J. and Ortiz, A. Estrus synchronization with melengestrol acetate in cyclic ewes. Insemination with fresh or frozen semen during the first or second estrus post treatment. Theriogenology **41**: 1385-1392. 1994.
- Rajamahendran, R. and Sianangama, P.C. Effect of human chorionic gonadotrophin on dominant follicles in cows: formation of accessory corpora lutea, progesterone production and pregnancy rates. J. Reprod. Fert. **95**: 577-584. (1992).
- Roberts, R.M. Conceptus interferons and maternal recognition of pregnancy. Biol. Reprod. **40**: 449-452. (1989).
- Roberts, R.M., Imakawa, K., Niwano, Y., Kazemi, M., Malathy, P.V., Hansen, T.R., Glass, A.A. and Kronenberg, L.H. Interferon production by the preimplantation sheep embryo. J. Interferon Research **9**: 175-187. (1989).
- Roberts, R.M., Farin, E.C. and Cross, C.J. Trophoblast proteins and maternal recognition of pregnancy. Oxford Reviews of Reproductive Biology **12**: 147-180. (1990).
- Roberts, R.M. and Scalap-Francis, T. Maternal recognition of pregnancy and embryonic loss. Theriogenology **33**: 175-183. (1990).
- Roberts, R.M., Leaman, W.D. and Cross, C.J. Role of interferons in maternal recognition of pregnancy in ruminants. Society for Experimental Biology and Medicine **200**: 7-18. (1992).
- Robertson, D.M., Farnworth, P.G., Clarke, L., Jacobsen, J., Cahir, N.F., Burger, H.G. and de Kretser, D.M. Effects of bovine 35 kDa FSH-suppressing protein on FSH and LH in rat pituitary cells in vitro: comparison with bovine 31 kDa inhibin. J. Endocr. **124**: 417-423. (1990).
- Rodríguez, M.R. Efecto de la suplementación sobre el inicio de la actividad reproductiva de la oveja tabasco o pelibuey. Tesis de Doctorado en Producción Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. (1991).
- Roser, J.F., McCue, P.M. and Hoye, E. Inhibin activity in the mare and stallion. Domestic Animal Endocrinology **11** (1): 87-100. 1994.

Rowson, L.E.A. and Moor, R.M. Embryo transfer in the sheep: the significance of synchronizing oestrus in the donor and recipient animal. *J. Reprod. Fert.*, **11**: 207-212. (1966).

Rowson, L.E.A., Lawson, R.A.S., Moor, R.M. and Baker, A.A. Egg transfer in the cow: synchronization requirements. *J. Reprod. Fert.*, **28**: 427-431. (1972).

Ruttle, J., Lucero, S., Key, S., Daniels, M., Rodríguez, F. and Yin, H.S. Ovine estrus synchronization and superovulation using norgestomet B and Follicle Stimulating Hormone-Pituitary. *Theriogenology*, **30**: 421-427. (1988).

Salamonsen, L.A., Cherny, R.A. and Findlay, J.K. In-vitro studies of the effects of interferons on endometrial metabolism in sheep. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, **43**: 27-38. (1991).

SAS/STAT guide for personal computers, Version 6.03. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, USA. (1991).

Sato, E., Ishibashi, T. and Iritani, A. Purification and action sites of a follicle stimulating hormone inhibitor from follicular fluid. *J. Anim. Sci.*, **55**: 873-877. (1982).

Schwall, R.H., Sawyer, H.R. and Niswender, G.D. Differential regulation by LH and prostaglandins of steroidogenesis in small and large luteal cells of the ewe. *J. Reprod. Fert.*, **76**: 821-829. (1986).

Schiewe, M.C., Bush, M., Stuart, L.S. and Wildt, D.E. Laparoscopic embryo transfer in domestic sheep: a preliminary study. *Theriogenology*, **22**: 675-682. (1984).

Sheldrick, L. Oxytocin and luteal maintenance in the ewe. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, **43**: 105-107. (1991).

Silvia, W.J., Lewis, G.S., McCracken, J.A., Thatcher, W.W. and Wilson, L. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F<sub>2α</sub> during luteolysis in ruminants. *Biol. Reprod.*, **45**: 655-663. (1991).

Silvia, W.J. and Raw, R.E. Regulation of pulsatile secretion of prostaglandin F<sub>2α</sub> from the ovine uterus by ovarian steroids. *J. Reprod. Fert.*, **28**: 341-347. (1993).

Smith, K.B., Millar, M.R., McNeilly, A.S., Illingworth, P.J., Fraser, H.M. and Baird, D.T. Immunocytochemical localization of inhibin alpha-subunit in the human corpus luteum. *J. Endocr.*, **129**: 155-160. (1991).

Southee, J. A., Hunter, M. G. and Haresign, W. Function of abnormal corpora lutea *in vivo* after GnRH induced ovulation in the anoestrus ewe. *J. Reprod. Fert.*, **84**: 131-137. (1988a).

Southee, J.A., Hunter, M.G., and Haresign, W. Effect of hysterectomy on the short life-cycle corpus luteum produced after GnRH-induced ovulation in the anoestrous ewe. J. Reprod. Fert. **84**: 149-155. (1988b).

Srikandakamur, S., Ingrahan, R.H., Ellsworth, M., Archbald, L.F., Liao, A. and Godke, R.A. Comparison of solid-phase, no extraction radio-immunoassay for progesterone with an extraction assay for monitoring luteal function in the mare, bitch and cow. Theriogenology, **26**: 779-793. (1986).

Stefani, J.S., Palha, M.D.C., Christmann, L., Rosa, J.M., Silveira, M.C. and Rodrigues, J.L. Laparoscopic versus surgical transfer of ovine embryos. Theriogenology, **33**: 328. (1990).

Stewart, H.J., Flint, A.P.F., Lamming, G.E., McCann, S.H.E. and Parkinson, T.J. Antiluteolytic effects of blastocyst-secreted interferon investigated in vitro and in vivo in the sheep. J. Reprod. Fert., Suppl. **37**: 127-138. (1989).

Stewart, H.J., Guesdon, F.M.J., Payne, J.H., Charleston, B., Vallet, J.L. and Flint, A.P.F. Trophoblast interferon in early pregnancy of domestic ruminants. J. Reprod. Fert. Suppl. **45**: 59-68. (1992).

Taya, K., Kaneko, H., Watanabe, G. and Sasamoto, S. Inhibin and secretion of FSH in oestrous cycles of cows and pigs. J. Reprod. Fert. **43**: 151-162. (1991).

Thatcher, W.W., Bazer, F.W., Sharp, D.C. and Roberts, R.M. Interrelationship between uterus and conceptus to maintain corpus luteum function during early pregnancy: sheep, cattle, pig and horses. J. Anim. Sci. Suppl. **2**, **67**: 47-61. (1986).

Thatcher, W.W., MacMillan, K.L., Hansen, P.J. and Drost, M. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. Theriogenology, **31**: 149-165. (1989).

Tilbrook, A.J., de Kretser, D.M. and Clarke, I.J. Studies on the testicular source of inhibin and its route of secretion in rams: failure of the Leydig cell to secrete inhibin in response to a human chorionic gonadotrophin/LH stimulus. J. Endocr. **130**: 107-114. (1991).

Trejo, González A. Control de la Reproducción Caprina en Producción de Caprinos. ΔGT, Editor, S.A. 258-264. (1986).

Tsonis, C.G., Quigg, H., Lee, V.W.K., Leversha, L., Trounson, A.O. and Findlay, J.K. Inhibin in individual ovine follicles in relation to diameter and atresia. J. Reprod. Fert. **67**: 83-90. (1983).

Tsonis, C.G., Hillier, S.G. and Baird, D.T. Production of inhibin bioactivity by human granulosa-lutein cells: stimulation of LH and testosterone in vitro. J. Endocr. **12**: R11-R14. (1987).

Vallet, J.L., Bazer, F.W., Fliss, M.F.V. and Thatcher, W.W. Effect of ovine conceptus secretory proteins and purified ovine trophoblast protein-1 on interoestrous interval and plasma concentrations of prostaglandins-F2 $\alpha$  and E and 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin F-2 $\alpha$  in cyclic ewes. *J. Reprod. Fert.*, **84**: 493-504. (1988).

Vallet, J.L., Lamming, G.E. and Batten, M. Control of endometrial oxytocin receptor and uterine response to oxytocin by progesterone and oestradiol in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, **90**: 625-634. (1990).

Vane, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biology*, **231**: 232-235. (1971).

Vosniakou, A., Karagiannidis, A., Liberopoulos, A., Koptopoulos, G. and Tsakalof, P. Ovulation and lambing rates in karaguniki ewes after treatment with follicular fluid. *Theriogenology*, **35**: 785-798. (1991).

Wallace, J.M., McNeilly, A.S. and Baird, D.T. Ovulation rate and embryo survival in Damline ewes after treatment with bovine follicular fluid in the luteal phase of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.*, **75**: 101-109. (1985).

Wallace, J.M., Martin, G.B. and McNeilly, A.S. Changes in the secretion of LH pulses, FSH and prolactin during the preovulatory phase of the oestrous cycle of the ewe and the influence of treatment with bovine follicular fluid during the luteal phase. *J. Endocr.*, **116**: 123-135. (1988).

Walton, J. S., McNeilly, J. R., McNeilly, N. S. and Cunningham, F. J.: Changes in concentrations of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin and progesterone in the plasma of ewes during the transition from anoestrus to breeding activity. *J. Endocr.*, **75**: 127-136. (1977).

Wathes, D.C. and Denning-Kendall, P.A. Control of synthesis and secretion of ovarian oxytocin in ruminants. *J. Reprod. Fert.*, **45**: 39-52. (1992).

Wiepz, G.J., Wiltbank, M.C., Nett, T.M., Niswender, G.D. and Sawyer, H.R. Receptors for prostaglandins F2 $\alpha$  and E2 in ovine corpora lutea during maternal recognition of pregnancy. *Biol. Reprod.*, **47**: 984-991. (1992).

Wilmot, I. and Sales, D.I. Effect of an asynchronous environment on embryonic development in sheep. *J. Reprod. Fert.*, **61**: 179-184. (1981).

Wilmot, I., Sales, D.I. and Ashworth, C.J. The influence of variation in embryo stage and maternal hormone profiles on embryo survival in farm animals. *Theriogenology*, **23**: 107-119. (1985).



Wilmot, I., Ashworth, C.J., Springbett, A.J. and Sales, D.I. Effect of variation in embryo stage on the establishment of pregnancy, and embryo survival and growth in ewes with two embryos. *J. Reprod. Fert.*, **83**: 233-237. (1988).

Wiltbank, C.M., Wiepz, J.G., Knickerbocker, J.J., Belfiore, J.C. and Niswender, D.G. Proteins secreted from the early ovine conceptus block the action of prostaglandin F2 $\alpha$  on large luteal cells. *Biol. Reprod.*, **46**: 475-482. (1992).

Zarco, L., Stabenfeldt, G.H., Kindahl, H., Quirke, J.F. and Granström, E. Persistence of luteal activity in the non-pregnant ewe. *Anim. Reprod. Sci.*, **7**: 245-267. (1984).

Zarco, L., Stabenfeldt, G.H., Quirke, J.F., Kindahl, H. and Bradford, G.E. Release of prostaglandin F2 $\alpha$  and the timing of events associated with luteolysis in ewes with oestrous cycles of different lengths. *J. Reprod. Fert.*, **83**: 517-526. (1988a).

Zarco, L., Stabenfeldt, G. H., Basu, S., Bradford, G. E. and Kindahl, H. Modification of prostaglandin F2 $\alpha$  synthesis and release in the ewe during initial establishment of pregnancy. *J. Reprod. Fert.*, **83**: 527-536. (1988b).

Zhang, J., Weston, P.G. and Hixon, J.E. Influence of estradiol on the secretion of oxytocin and prostaglandin F2 $\alpha$  during luteolysis in the ewe. *Biol. Reprod.*, **45**: 395-403. (1991).

"... y yo me emborracho, canto,  
lloro y voy por las calles con el vestido  
hecho jirones ¡ porque estoy loco ! ¡ Qué  
lógica tan imbécil ! Locos son los que viven  
sin voluntad de vivir, tan sólo por temor  
a la muerte, locas las que pretenden  
matar sus sentimientos y por el qué dirán  
no huyen con un cirquero...locos los que  
se arrodillan delante de un ente igual a  
ellos, que masculla latín y viste sotana,  
para contarle cosas sucias como esas  
lavanderas que bajan al río todos los  
sábados, a lavar su camisa, a sabiendas de  
que a la siguiente semana volverán a lo  
mismo porque no tienen otra que ponerse, y  
más locos que yo los que no ríen, ni lloran,  
ni beben porque son esclavos de inútiles  
respetos sociales..."

Pito Pérez.