

01669



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACION

**EFEECTO DE LA APLICACION DE LIQUIDO FOLICULAR
EQUINO LIBRE DE ESTEROIDES SOBRE LA FUNCION
LUTEA DE OVEJAS EN ANESTRO ESTACIONAL
INDUCIDAS A OVULAR CON hCG.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MAESTRO EN PRODUCCION ANIMAL

P R E S E N T A :

Juan Prisciliano Zárate Martínez

ASESORES: PhD. Luis Alberto Zarco Quintero
MPA. Vicente Octavio Mejía Villanueva.



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
CALLE DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

DEDICATORIA

A mi esposa **Nora Lia** y a mis hijos **Juan Manuel y Miguel Angel** por darme la oportunidad de ser, y al mismo tiempo entregarme sin reservas todo su amor y confianza.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre por todo lo que me ha dado

" AURORA DIOS TE BENDIGA "

Les agradezco a Sofía y a Pirú por querer tanto a mis hijos y a mi esposa, pues esto me da tranquilidad al saber que nunca están solos.

Agradezco a mis asesores Luis Zarco Quintero y Octavio Mejía Villanueva por ayudarme a alcanzar una de mis metas.

Agradezco al Dr. Heriberto Román Ponce por confiar en mí y ayudarme a superarme.

Agradezco al Dr. Joel Hernández Cerón por todo el apoyo que me brindó durante mi estancia en el Departamento de Reproducción.

Agradezco a Juan Alberto Balcázar Sánchez por toda su ayuda y amistad que me ofreció, con las cuales pude realizar mi trabajo de tesis.

Agradezco al Dr. Leonel Martínez Rojas por toda su ayuda y consejos bien intencionados.

Agradezco al Dr. Javier Valencia Méndez por toda la ayuda y amistad que me brindó.

Agradezco toda su ayuda y amistad a:

Adriana	Miryam	Clara	Israel	Carlos	Dra. Páramo
Carolina	Pilar	Mariana	José Luis	Enrique	Dr. Porras
Veronica	Veronica	Susana	José Ramón	Francisco	Dr. Romo

Agradezco al Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de mejorar mi formación como Médico Veterinario.

Agradezco a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Universidad Nacional Autónoma de México por aceptarme y darme todas las facilidades para poder realizar mis estudios de maestría.

CONTENIDO

	PAGINA
RESUMEN	.
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	
2.1.1 Regulación de la secreción de Prostaglandina F _{2α}	3
2.1.2 Mecanismo de acción de la Prostaglandina F _{2α}	5
2.2 Cuerpos lúteos de corta duración	6
2.3 Líquido folicular e inhibina	7
2.4 Utilización de líquido folicular para evitar la regresión prematura del cuerpo lúteo.	9
III. OBJETIVOS	10
IV. MATERIAL Y METODOS	
4.1 Localización	11
4.2 Obtención de Líquido Folicular Equino libre de esteroides	11
4.3 Animales y tratamiento	12
4.4 Análisis estadístico	12
V. RESULTADOS	
5.1 Concentraciones de progesterona plasmática	14
5.2 Efecto de la aplicación de Líquido Folicular Equino sobre las concentraciones promedio de progesterona.	20
VI. DISCUSION	23
VII. CONCLUSIONES	25
VIII. LITERATURA CITADA	26

RESUMEN

Zárate Martínez Juan Prisciliano. EFECTO DE LA APLICACION DE LIQUIDO FOLICULAR EQUINO LIBRE DE ESTEROIDES SOBRE LA FUNCION LUTEA DE OVEJAS EN ANESTRO ESTACIONAL INDUCIDAS A OVULAR CON hCG. Bajo la supervisión de: PhD. Luis Alberto Zarco Quintero y MPA. Vicente Octavio Mejía Villanueva.

El trabajo se realizó en el Centro de Enseñanza Práctica, Investigación y Extensión en Rumiantes, ubicado en el Km 29 de la carretera federal México Cuernavaca. El objetivo fue comprobar si la elevación de progesterona (P4) que se ha observado en ovejas a las que se les aplica Líquido Folicular Equino libre de esteroides (LFE) es dependiente de la presencia de un cuerpo lúteo. Se utilizaron 24 ovejas a las cuales durante el mes de mayo se les tomaron muestras de sangre 2 veces por semana durante 2 semanas para determinar los niveles de P4 y confirmar el anestro estacional. Posteriormente se formaron aleatoriamente 4 grupos: A las ovejas del grupo hCG+LFE se les aplicaron 1000 UI de hCG para inducir la ovulación, y a partir del tercer día de la inducción se les administró por vía endovenosa 3 ml de LFE libre de esteroides cada 8 h durante 12 días; las ovejas del grupo hCG también se indujeron a ovular con 1000 UI de hCG, pero no se les aplicó LFE; a las ovejas del grupo LFE no se les indujo a ovular ni se les aplicó LFE; las ovejas del grupo testigo no fueron inducidas a ovular ni se les aplicó LFE. A todos los animales se les tomaron muestras de sangre cada 4 h durante 12 días y se determinaron los niveles de P4 por radioinmunoanálisis. Se determinó la duración de la fase lútea de los dos grupos inducidos a ovular, encontrándose que en el grupo tratado con hCG y LFE el 80% de los animales presentaron fases lúteas normales y el restante 20% presentaron cuerpos lúteos de corta duración. En contraste en el grupo tratado solamente con hCG todas las fases lúteas fueron de corta duración. Para los efectos de la presencia o ausencia de cuerpo lúteo (inducción de ovulación o no) y de la aplicación de LFE sobre los niveles de P4 se utilizó un análisis de varianza de 2 factores (Tratamiento y Día) con el efecto de animal anidado dentro del Tratamiento. Se compararon los días en que se produjeron diferencias entre grupos utilizando la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los efectos de tratamiento, día y la interacción tratamiento por día, fueron altamente significativos ($p < 0.01$). Se observó que desde el día 5 del ciclo, las concentraciones de P4 de las ovejas del grupo hCG+LFE comenzaron a elevarse más que en los otros grupos. Y a partir del día 6 las concentraciones fueron estadísticamente más elevadas ($p < 0.01$) que en los otros tres grupos. La aplicación de LFE en el grupo que no fue inducido a ovular no resultó en concentraciones mayores de progesterona en comparación con el grupo testigo, por lo que la elevación en las concentraciones de P4 no se debe a que el LFE contenga P4 o estimule su producción en algún tejido diferente al cuerpo lúteo, ya que no se produce en ausencia de este último. Se concluye que el LFE es capaz de estimular la función lútea y alargar la vida de los cuerpos lúteos en ovejas inducidas a ovular con hCG.

I INTRODUCCION

En los rumiantes existen varias condiciones fisiológicas en las cuales se producen ciclos estrales de corta duración debido a una regresión prematura del cuerpo lúteo. Así, en el primer ciclo estral al llegar a la pubertad , al inicio de la época reproductiva, y en el primer ciclo estral post-parto, se desarrollan cuerpos lúteos de corta duración (18,28).

Las causas de la corta vida de estos cuerpos lúteos todavía no se conocen completamente. Sin embargo, diversos estudios indican que puede deberse a una liberación prematura de prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) (18).

Se ha demostrado que al inducir la ovulación en ovejas en anestro mediante la administración de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) (3,11), o con la hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH) se provoca la formación de cuerpos lúteos de corta duración (3,40,41,56,), por lo que estos tratamientos se han establecido como un modelo para el estudio de esta deficiencia lútea y su posible prevención (18,28).

En ovejas inducidas a ciclar con hCG durante el anestro también se ha demostrado que es posible evitar la regresión prematura del cuerpo lúteo mediante la administración de líquido folicular equino libre de esteroides (LFE) (3), el cual es rico en inhibina (51). También ha sido posible retrasar la luteólisis en ciclos estrales normales mediante la administración de LFE (45) o de líquido folicular bovino libre de esteroides (48).

Estos efectos aparentemente se deben a que la inhibina, al reducir la secreción hipofisaria de FSH (1,42) suprime el desarrollo folicular (14,46) y la secreción de estrógenos de estos folículos (3). El establecimiento de un patrón luteolítico (pulsátil) de secreción de $PGF2\alpha$ (62) requiere de la presencia de estrógenos (38), por lo que al bloquearse la producción de estrógenos no se destruye el cuerpo lúteo.

Además de sus efectos luteolíticos, en los estudios realizados hasta la fecha, se ha encontrado un efecto inesperado del LFE, que consiste en la elevación de las concentraciones circulantes de progesterona desde el inicio del tratamiento (3,45). Este efecto luteotrópico es independiente de la inhibición de la luteólisis, ya que se presenta desde mucho antes de que las

ovejas no tratadas con LFE inicien la luteólisis . Además el efecto parece ser específico del LFE, ya que no se ha observado cuando se utiliza líquido folicular bovino como fuente de inhibina (5,48). El objetivo del presente trabajo es determinar el origen de esta elevación en los niveles de progesterona, pues podría deberse a la acción directa del LFE sobre el cuerpo lúteo, a la estimulación de la producción de progesterona en un sitio diferente al cuerpo lúteo, o a la presencia de progesterona como contaminante en el LFE.

II REVISION DE LITERATURA

2.1.1 REGULACION DE LA SECRECION DE PROSTAGLANDINA F2 α

El cuerpo lúteo es una glándula endócrina transitoria que se desarrolla después de la ovulación a partir de las células de la teca interna y de la granulosa . La destrucción del cuerpo lúteo (luteólisis) al final del ciclo estral es causada por la secreción de PGF2 α de origen uterino. Entre el día 14 y 15 del ciclo estral de la oveja no gestante se establece un patrón de secreción pulsátil de PGF2 α de origen uterino, lo cual provoca una caída brusca de los niveles de progesterona, alcanzando niveles basales menores a 0.2 ng/ml dentro de las siguientes 24 horas (61,62).

Las prostaglandinas son ácidos carboxílicos con 20 carbonos que contienen un anillo de 5 elementos, y pueden tener uno, dos o tres dobles enlaces en sus cadenas laterales. La actividad biológica requiere un grupo carboxílico en posición 1, un doble enlace en C-13 y un β -hidroxilo en C-15 (20). El precursor principal de las prostaglandinas naturales es el ácido graso esencial, insaturado, de 20 carbonos llamado ácido araquidónico (20). El primer paso de la síntesis de prostaglandinas es la liberación del ácido araquidónico a partir de fosfolípidos de la membrana celular . Esta liberación es catalizada por la fosfolipasa A2 (17). Varios estímulos, entre ellos la distorsión mecánica de la membrana, los cambios de los flujos iónicos, la isquemia, las hormonas y los fármacos, pueden activar las fosfolipasas tisulares mediante un proceso que depende de flujo de iones de Ca⁺⁺ a partir de reservas extra e intracelulares (20). En la conversión de ácido graso libre a prostaglandina ocurre una introducción de oxígeno en los C-9 y C-11, y el compuesto formado por esta reacción es el endoperoxido PGG y PGH. Para que estos dos compuestos se formen es necesario que la reacción sea catalizada por la enzima cicloxigenasa (20).

Una vez formado el endoperoxido, el producto final que se sintetiza en un tejido determinado depende de qué enzimas metabolizantes del endoperoxido estén presentes en dicho tejido. Por ejemplo por la acción de la endoperoxido reductasa se forma la PGF2 α (52).

El establecimiento de un patrón de secreción pulsátil de PGF2 α por parte del útero origina la lisis o regresión del cuerpo lúteo (61,62,63), por lo que al momento en que se

establezca este patrón pulsátil determina la duración de la fase lútea (62).

Aunque los mecanismos precisos que regulan la síntesis y secreción de $\text{PGF2}\alpha$ no están completamente claros, se conoce que la progesterona, el estradiol de origen ovárico y la oxitocina, tanto de origen ovárico como hipofisiario, tienen un papel importante en la generación de los pulsos de la $\text{PGF2}\alpha$ uterina (16,38,55).

La progesterona producida por el cuerpo lúteo antes de la luteólisis ejerce dos tipos de efectos que contribuyen a la regulación de la secreción de $\text{PGF2}\alpha$; el primero consiste en la preparación del útero para la secreción de prostaglandinas ya que su prolongada exposición a la progesterona durante la fase lútea promueve la acumulación de sustancias precursoras para la síntesis de la $\text{PGF2}\alpha$, como el ácido araquidónico y enzimas como la sintetasa de prostaglandinas (38,54). Por otro lado, la progesterona evita que en el útero aumente la concentración de receptores para estrógenos ya que causa su destrucción (38,55).

Para que el útero pueda responder a los estrógenos debe haber estado expuesto a la progesterona durante al menos 10 a 12 días (31,33,59), ya que después de 10 días de exposición del útero a la progesterona, esta hormona provoca la destrucción de sus propios receptores uterinos (38); por lo que después del día 12 del ciclo estral normal la progesterona deja de bloquear la acumulación de receptores para estrógenos.

A partir de ese momento el estradiol producido por los folículos ováricos estimula en el endometrio la producción de enzimas como la fosfolipasa A y la cicloxigenasa, que son indispensables para la síntesis de $\text{PGF2}\alpha$ (54). Además, el estradiol estimula la síntesis de receptores para oxitocina en el endometrio, con lo cual la oxitocina producida por el cuerpo lúteo interactúa con sus receptores recientemente sintetizados, lo que estimula la secreción endometrial de $\text{PGF2}\alpha$ (38). A partir de ese momento se establece un mecanismo de retroalimentación positiva entre la oxitocina y la $\text{PGF2}\alpha$, el cual llega a su fin con la luteólisis total (38). El estradiol de origen folicular es indispensable tanto para la aparición inicial de receptores de oxitocina, como para su reaparición después de cada episodio de secreción de $\text{PGF2}\alpha$ (38).

Durante la regresión natural del cuerpo lúteo es importante que se establezca la secreción pulsátil de $\text{PGF2}\alpha$, pues se requieren de 4 a 6 pulsos secretados a intervalos de 5 o 6 horas entre pulso y pulso para que la luteólisis sea completa e irreversible (61,62). El establecimiento de este patrón se debe a que al fijarse la oxitocina a sus receptores, estos son internalizados, por lo que el útero deja de responder a la hormona. Bajo la influencia de los estrógenos, el endometrio vuelve a sintetizar receptores para oxitocina, los cuales tardan 5 o 6 horas en volver a la membrana, por lo que después de este tiempo el útero puede volver a responder a la oxitocina liberando $\text{PGF2}\alpha$ (38,54).

2.1.2 MECANISMO DE ACCION DE LA $\text{PGF2}\alpha$

En la oveja el primer efecto de la $\text{PGF2}\alpha$ aparece como un rápido decremento de los niveles séricos de progesterona (19). Inicialmente no hay una reducción en los receptores para LH en ovejas a las cuales se les administra un patrón luteolítico de $\text{PGF2}\alpha$ (10). La reducción en la concentración de receptores para LH sólo se produce después de que se reducen los niveles séricos de progesterona (10). Esta observación es particularmente interesante porque los receptores para LH se encuentran en las células lúteas pequeñas, mientras que los receptores para $\text{PGF2}\alpha$ están en las células lúteas grandes (15), lo que sugiere que existe una comunicación entre estas células del cuerpo lúteo. El número de células lúteas grandes y los niveles séricos de progesterona se ven reducidos significativamente dentro de las primeras 12 horas después de la aplicación de una dosis luteolítica de $\text{PGF2}\alpha$, pero el número de células pequeñas no disminuyen sino hasta después de 24 horas (6).

Datos obtenidos en la oveja demostraron que la $\text{PGF2}\alpha$ actúa a través de dos diferentes sistemas de mensajeros intracelulares (19). Por una parte la $\text{PGF2}\alpha$ activa la protein-kinasa C (PK-C) en las células lúteas grandes, lo que inhibe la secreción de progesterona en dichas células. Sin embargo, la activación de la PK-C no induce un efecto de citotoxicidad (19), por lo tanto no causa luteólisis estructural (39).

Otro efecto de la $\text{PGF2}\alpha$ en las células lúteas grandes es el incremento intracelular de los niveles libres de Ca^{++} , lo que al parecer provoca el efecto citotóxico de la $\text{PGF2}\alpha$ (19).

También se ha observado que los tratamientos con un régimen luteolítico de $\text{PGF}_2\alpha$ resultan en una rápida disminución en las concentraciones de RNAm para la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) (21). Esto indica aparentemente que la $\text{PGF}_2\alpha$ tiene un efecto específico sobre la transcripción del gen para 3β HSD, o influye sobre la degradación del RNAm para dicha enzima. Aunque las acciones celulares y moleculares de la $\text{PGF}_2\alpha$ en la oveja han empezado a entenderse, esta hormona puede actuar en forma diferente en otras especies.

2.2 CUERPOS LUTEOS DE CORTA DURACION

La posibilidad de inducir el estro y la ovulación en ovejas prepúberes ofrece la ventaja de reducir la edad al primer parto (3). Por otra parte, la inducción de ovulación en ovejas adultas durante la época de anestro estacional puede adelantar la época de empadre y reducir el intervalo entre partos.

En el ovino generalmente se presentan fases lúteas cortas durante el primer ciclo estral que se presenta al inicio de la pubertad, al inicio de la época reproductiva y durante la primera ovulación postparto (2, 18, 27). Se han realizado diversos estudios para comprender el mecanismo que provoca la formación de cuerpos lúteos de corta duración con el fin de desarrollar métodos para alargar la función lútea y mejorar la eficiencia reproductiva (3, 5, 50, 56).

Para estudiar esta disfunción lútea se ha utilizado como modelo el cuerpo lúteo de corta duración que se forma después de la primera ovulación inducida con GnRH (5, 25, 26, 27, 40, 41, 50, 56, 57) o hCG (3, 24) en época de anestro.

Este cuerpo lúteo no sufre regresión prematura cuando se realiza un pretratamiento con progestágenos antes de inducir la ovulación (25, 40).

Evidencias recientes han demostrado que el cuerpo lúteo de corta duración es intrínsecamente normal (3, 18) y que su vida corta se debe a una programación inadecuada de la secreción de $\text{PGF}_2\alpha$ (8, 9, 24, 26, 57) debido a una pobre exposición uterina a la progesterona

del ciclo estral anterior lo que promueve la aparición prematura de receptores para estrógenos y oxitocina (28,33,59,64), lo que conduce al establecimiento prematuro de un patrón luteolítico de $\text{PGF2}\alpha$ (8,26,64).

En los animales con fase lútea corta la fertilización no se ve afectada, sin embargo, la gestación no se establece debido a que el embrión no tiene tiempo de proporcionar el mensaje para el reconocimiento materno de la gestación (4).

2.3 LIQUIDO FOLICULAR E INHIBINA

El líquido folicular cumple varias funciones dentro de la fisiología ovárica de los mamíferos, incluyendo la esteroidogénesis, el crecimiento folicular, la maduración del ovocito, la ovulación y el transporte del ovocito por el oviducto. El líquido folicular contiene diferentes componentes no esteroideos, como las sustancias inhibitoras del desarrollo folicular, entre las que se incluyen a la inhibina y la folistatina (13,14), y sustancias activadoras como la activina (13,14), además de diversas proteínas ováricas inhibitoras: 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 (23,29,53). La inhibina es una glicoproteína gonadal formada por dos subunidades (α y β) unidas por puentes disulfuro. Esta glicoproteína se acumula en el líquido folicular de todos los mamíferos, incluyendo a la oveja (13,43). Se ha demostrado que son las células de la granulosa de los folículos antrales las que producen la inhibina (7,12,30,51). La FSH estimula el crecimiento, la mitosis y la completa diferenciación de las células de la granulosa de los folículos preovulatorios, para que adquiera su máxima actividad aromatizante y se produzcan cantidades importantes de inhibina (1,22,44). Existe una correlación positiva entre la concentración de inhibina en el líquido folicular y el número de células de la granulosa por folículo, así como también una correlación positiva de la concentración de inhibina con el diámetro folicular, pero sólo en relación a folículos no atrésicos (22).

En la oveja tanto la FSH como la hormona luteinizante (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 (11,35,36,37). La inhibina actúa directamente a nivel hipofisiario suprimiendo la síntesis y la secreción de la FSH (13).

Después de la ovulación hay un segundo pico de FSH, el cual ocurre 24 horas después del pico de LH, este segundo pico de FSH tiene como finalidad reclutar y madurar los siguientes folículos preovulatorios (28). El pico secundario de FSH se produce debido a que después de la ovulación hay una disminución marcada de la secreción pulsátil de estradiol e inhibina, por lo que se reduce la retroalimentación negativa sobre la secreción de FSH (1). Además la secreción de androstenediona y testosterona también están suprimidas, lo que sugiere que la inhibición en la secreción de estradiol es debida a una desensibilización de las células de la teca.

Debido a su gran cantidad de inhibina la administración de líquido folicular bovino en ovejas provoca una disminución en las concentraciones circulantes de FSH, por lo que en las ovejas así tratadas se reduce el número de folículos y el diámetro de los folículos más grandes (46). La actividad folicular inhibida provoca un retraso en el inicio del estro en ovejas y vaquillas (46). Por otra parte, se ha demostrado que el líquido folicular equino (LFE) también contiene grandes cantidades de inhibina, por lo que el tratamiento con LFE libre de esteroides suprime la secreción de FSH en yeguas (47).

2.4 UTILIZACION DE LIQUIDO FOLICULAR PARA EVITAR LA REGRESION PREMATURA DEL CUERPO LUTEO

En ovejas inducidas a ciclar con hCG durante el anestro se ha demostrado que es posible evitar la regresión prematura del cuerpo lúteo mediante la administración de líquido folicular equino libre de esteroides (LFE), (3). También ha sido posible retrasar la luteólisis en ciclos estrales normales mediante la administración de LFE (24) o de líquido folicular bovino libre de esteroides (48).

Estos efectos aparentemente se deben a que la inhibina, al inhibir la secreción hipofisiaria de FSH (1,42) suprime el desarrollo folicular (14,46) y por lo tanto la secreción de estrógenos (3). Los estrógenos son indispensables para que el útero pueda establecer un patrón luteolítico (pulsátil) de secreción de $\text{PGF2}\alpha$ (38,62) por lo que al no haber estrógenos en animales tratados con líquido folicular no se destruye el cuerpo lúteo (5).

En los estudios realizados hasta la fecha se ha encontrado un efecto inesperado del LFE , este efecto consiste en la elevación de las concentraciones circulantes de progesterona desde el inicio del tratamiento con LFE (3,45). Este efecto luteotrópico es independiente de la inhibición de la luteólisis, ya que se presenta desde mucho antes de que las ovejas no tratadas con LFE inicien la luteólisis . Además el efecto parece ser específico del LFE, ya que no se ha observado cuando se utiliza líquido folicular bovino como fuente de inhibina (5,48). El objetivo del presente trabajo es determinar el origen de la elevación en los niveles de progesterona, pues podría deberse a la acción directa del LFE sobre el cuerpo lúteo, a la estimulación de la producción de progesterona en un sitio diferente al cuerpo lúteo o a la presencia de progesterona como contaminante en el LFE.

III OBJETIVOS ESPECIFICOS

Evaluar si el LFE estimula la función lútea, para la cual se compararon los perfiles de progesterona circulante durante los primeros 7 días postovulación en ovejas inducidas a ovular con hCG y tratadas o no con LFE.

Evaluar si el LFE estimula o provoca una elevación en las concentraciones de progesterona de origen no lúteo, para lo que se compararon los perfiles de progesterona en ovejas en anestro tratadas o no con LFE.

IV MATERIAL Y METODOS

4.1 LOCALIZACION

Este trabajo se realizó en el Centro de Enseñanza Práctica, Investigación y Extensión en Rumiantes (CEPIER), dicho centro se encuentra ubicado en el km 29 de la carretera federal México Cuernavaca, Delegación Tlalpan, D.F. a 2760 msnm, 19° latitud norte y 99° longitud oeste. El clima de la región es de tipo c(w) (w) b (ij), que corresponde al clima semifrío-semihúmedo, con lluvias en verano y una precipitación pluvial de 800 a 1200 mm.

4.2 OBTENCION DE LIQUIDO FOLICULAR EQUINO LIBRE DE ESTEROIDES

El Líquido Folicular Equino se obtuvo con jeringas estériles a partir de folículos ováricos de yeguas sacrificadas en un rastro local.

El líquido obtenido se depositó en frascos con tapón de rosca, que se mantuvieron en hielo para su posterior transporte al laboratorio, en donde se sometió a una primera centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos a - 4 °C con la finalidad de eliminar las impurezas y detritos celulares. Posteriormente, y con la finalidad de remover las hormonas esteroideas presentes en el líquido folicular se le añadió carbón vegetal activado (10 mg/ml) más dextran (0.1 mg/ml), y se agitó durante una hora a 25°C. Para retirar el carbón activado el líquido se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos a - 4 °C, procediendo a decantarse el líquido sin carbón en un tubo. El proceso de centrifugación y de decantación se repitió 6 veces y se filtró en papel filtro del número 1 para clarificarlo. El líquido obtenido después de la sexta centrifugación se consideró libre de esteroideas (LFE); para conservarlo se le añadió penicilina G sódica (100 UI/ml) para evitar la contaminación microbiana y se mantuvo a - 20 °C hasta su utilización (34).

4.3 ANIMALES Y TRATAMIENTO

Se utilizaron 24 ovejas a las cuales antes de iniciar el experimento se les tomaron muestras de sangre yugular 2 veces por semana durante 2 semanas para determinar los niveles de progesterona y confirmar el estado de anestro estacional. De las 24 ovejas evaluadas, 5 ya estaban ciclando, por lo que fueron eliminadas del estudio, las restantes 19 se encontraban en anestro y fueron distribuidas al azar en 4 grupos experimentales. A las hembras del primer grupo (Grupo hCG+LFE) $n = 5$ se les aplicaron 1000 UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) para inducir la ovulación (3,12), y a partir del tercer día de la inducción se les aplicaron por vía endovenosa 3 ml de LFE libre de esteroides cada 8 horas durante 12 días (3). El segundo grupo (Grupo hCG) $n = 5$ también se indujo a ovular con 1000 UI de hCG pero a este grupo no se le aplicó LFE. Al tercer grupo (Grupo LFE) $n = 5$ no se le indujo a ovular con hCG, pero si se les aplicó 3 ml de LFE libre de esteroides cada 8 horas durante 12 días. El cuarto grupo (Grupo testigo) $n = 4$ no fue inducido a ovular con hCG ni se le aplicó LFE libre de esteroides. A todos los animales de los 4 grupos se le tomó una muestra de sangre cada 4 horas durante 12 días. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción yugular en tubos con heparina, para posteriormente centrifugarse y separar el plasma. El plasma se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la determinación de los niveles de progesterona mediante radioinmunoanálisis en fase sólida (58).

4.4 ANALISIS ESTADISTICO

Se definió la longitud de la fase lútea como el intervalo de tiempo entre el momento en que las concentraciones de progesterona se elevaron por encima de 1 ng/ml y el momento en que bajaron de ese nivel (62). En base a lo anterior las fases lúteas se clasificaron en normales, cuando duraron 10 o más días, y de corta duración cuando duraron menos de 10 días. Se determinó el porcentaje de ovejas de cada grupo que presentaron ovulación, y las que permanecieron en anestro, por medio de la prueba exacta de Fisher. La proporción de ovulaciones que resultaron en cuerpos lúteos normales o en cuerpos lúteos de corta duración se comparó también mediante la prueba exacta de Fisher. En todos los grupos se consideró como

día 0 el momento en que los grupos tratados con hCG recibieron esta hormona. Para comparar las concentraciones de progesterona en diferentes días y distintos grupos de ovejas se utilizó un análisis de varianza multifactorial para mediciones repetidas; en el que se consideraron como variables independientes el tratamiento y el día del ciclo estral, con el efecto del animal anidado dentro del tratamiento. Para determinar en que días se produjeron diferencias significativas en los valores de progesterona entre grupos, se utilizó la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples (49). Se comparó mediante la prueba de " t " de Student el área bajo la curva de progesterona durante la primera fase lútea en los grupos hCG y hCG+LFE.

V RESULTADOS

5.1 CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA PLASMÁTICA

En la figura 1 se muestra las concentraciones de progesterona de cada una de las ovejas del grupo hCG+LFE. Cuatro de las 5 ovejas de este grupo (5581,506,1391 y 501) formaron cuerpos lúteos de duración normal. En ellas, las concentraciones de progesterona se elevaron gradualmente a partir del día 3, llegando a 1 ng/ml entre el día 4 y 7 y manteniéndose por encima de este nivel durante por lo menos 10 días. Sólo en una de las 5 ovejas del grupo hCG+LFE se formó un cuerpo lúteo de corta duración (179). En este animal las concentraciones de progesterona sólo se mantuvieron ligeramente elevadas entre los días 4 y 7.

En el cuadro 1 se muestra el porcentaje de animales de cada grupo que ovularon, así como la clasificación de las ovulaciones de acuerdo a si el cuerpo lúteo formado tuvo duración normal o fue de corta duración.

Se observa que todos los animales tratados con hCG (grupos hCG y hCG+LFE) ovularon, mientras que la totalidad de los animales no tratados con hCG (grupos LFE y testigo) se mantuvieron en anestro. Al comparar el tipo de cuerpos lúteos formados se observa que el grupo hCG+LFE tuvo menos cuerpos lúteos de corta duración (20%) que el grupo hCG (100%).

En contraste, todas las ovejas del grupo hCG formaron cuerpos lúteos de corta duración. En la figura 2 se observa que en ellas las concentraciones de progesterona sólo se elevaron transitoriamente después del día 3, regresando a niveles basales entre el día 6 y 7. En las ovejas de este mismo grupo se observa que después de regresar el cuerpo lúteo de corta duración se produjo una segunda ovulación, con formación de cuerpo lúteo normal, por lo que las concentraciones de progesterona que se elevan por segunda vez entre el día 10 y 18, permanecen elevadas durante 10 días.

En el grupo LFE los animales sólo fueron sometidos al tratamiento con LFE sin inducirlos previamente a ovular, encontrándose que solo uno de los animales 5 animales presentó concentraciones de progesterona indicativas de función lútea (figura 3). En todos los animales del grupo LFE se produjo una elevación en las concentraciones de progesterona

alrededor de 8 días después de suspenderse la administración de LFE.

En el grupo testigo los cuatro animales permanecieron con niveles basales de progesterona durante todo el muestreo (figura 4), indicando que aún se encontraban en anestro estacional.

En el cuadro 1 se muestra el porcentaje de animales de cada grupo que ovularon, así como la clasificación de las ovulaciones de acuerdo a si el cuerpo lúteo formado tuvo duración normal o fue de corta duración. Se observa que todos los animales tratados con hCG (grupos hCG y hCG+LFE) ovularon, mientras que la totalidad de los animales no tratados con hCG (grupos LFE y testigo) se mantuvieron en anestro. Al comparar el tipo de cuerpos lúteos formados se observa que el grupo hCG+LFE tuvo menos cuerpos lúteos de corta duración (20%) que el grupo hCG (100%).

CUADRO 1. PORCENTAJE DE OVEJAS QUE PRESENTARON OVULACION, ANESTRO CUERPOS LUTEOS NORMALES, Y CUERPOS LUTEOS DE CORTA DURACION EN LOS 4 GRUPOS EXPERIMENTALES.

GRUPO	ACTIVIDAD OVARICA		TIPO DE CUERPO LUTEO	
	OVULACION %	ANESTRO %	NORMAL %	CORTO %
hCG+LFE*	100	0	80	20
hCG**	100	0	0	100
LFE***	20	80	0	100
TESTIGO****	0	100	-	-

a,b,c para una determinada variable (columna) valores que no comparten literal son significativamente diferentes (p<0.05)

* hCG+LFE - Ovejas tratadas con 1000 U.I. de hCG en el día 0 y con 3 ml de Líquido Folicular Equino libre de esteroides cada 8 horas desde el día 3 hasta el día 14.

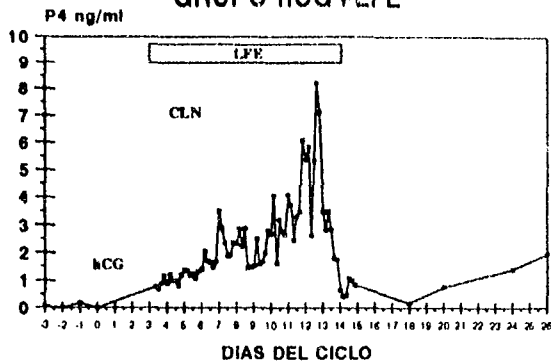
** hCG - Ovejas tratadas con 1000 U.I. de hCG en el día 0.

*** LFE - Ovejas tratadas con líquido folicular equino libre de esteroides cada 8 horas desde el día 3 hasta el día 14.

**** Testigo - No recibieron tratamiento.

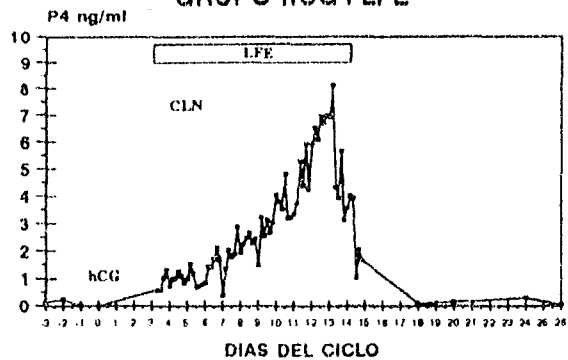
OVEJA # 5581

GRUPO hCG+LFE



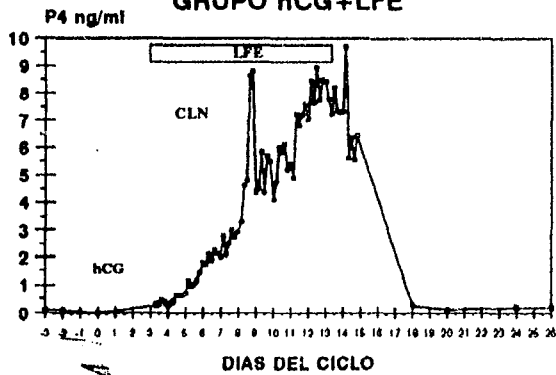
OVEJA # 506

GRUPO hCG+LFE



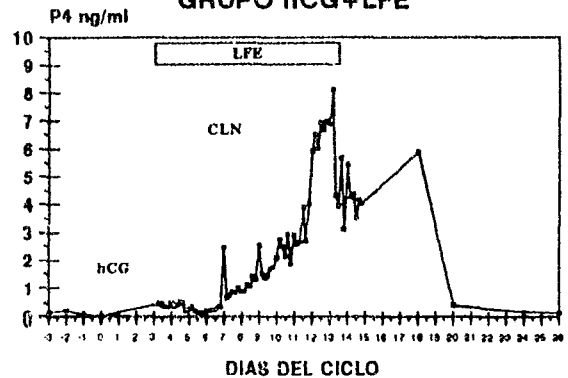
OVEJA # 1391

GRUPO hCG+LFE



OVEJA # 501

GRUPO hCG+LFE



OVEJA # 179

GRUPO hCG+LFE

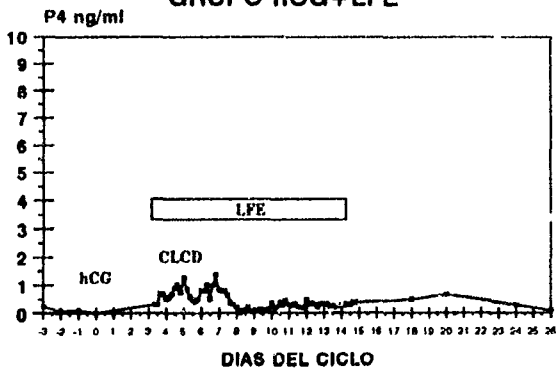
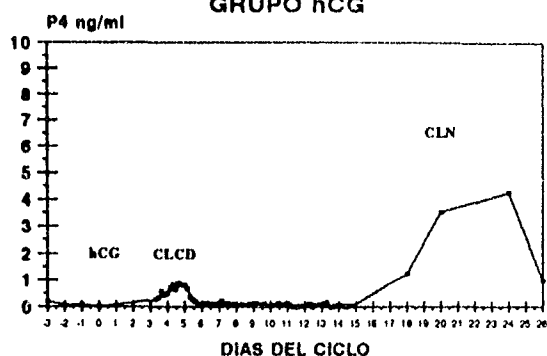
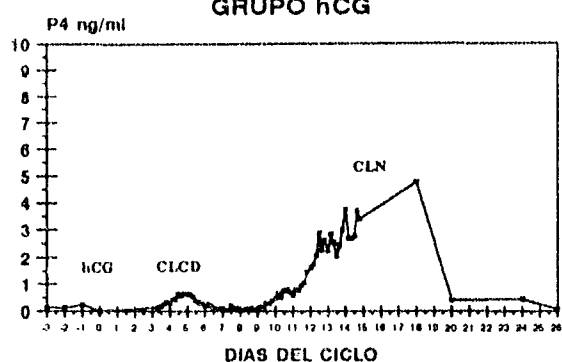


FIGURA 1. Concentraciones de progesterona plasmática en las ovejas del grupo hCG+LFE, las cuales fueron inducidas a ovular con 1000 U.I. de hCG y tratadas con 3 ml de LFE libre de esteroides cada 8 horas entre los días 3 y 14 posteriores a la inyección de hCG. Cuatro de las ovejas (5581,506,1391 y 501) formaron cuerpos lúteos normales, mientras que una oveja (179) formó un cuerpo lúteo de corta duración. El día 0 representa el momento en que se administró la hCG . El período de administración de LFE se indica con una barra. Los cuerpos lúteos de corta duración se indican como CLCD y los cuerpos lúteos normales como CLN.

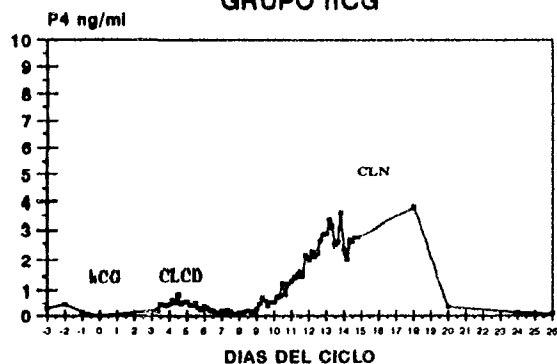
OVEJA # 205
GRUPO hCG



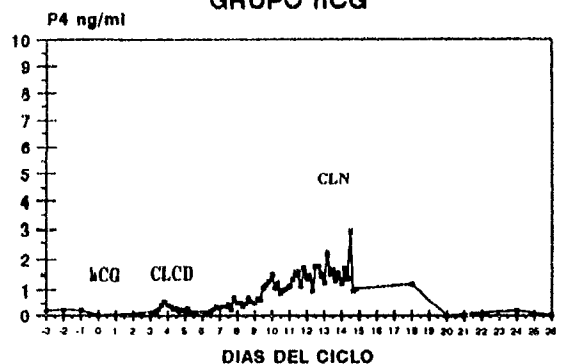
OVEJA # 101
GRUPO hCG



OVEJA # 2291
GRUPO hCG



OVEJA # 1891
GRUPO hCG



OVEJA # 3092
GRUPO hCG

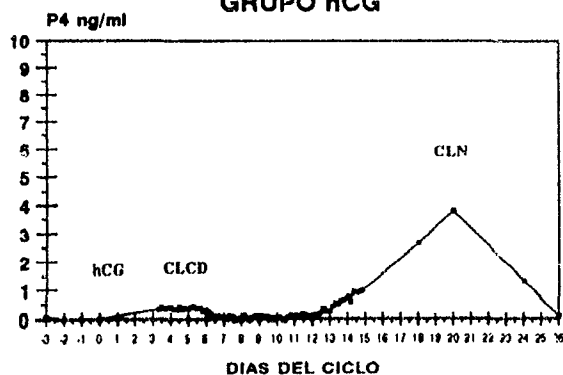
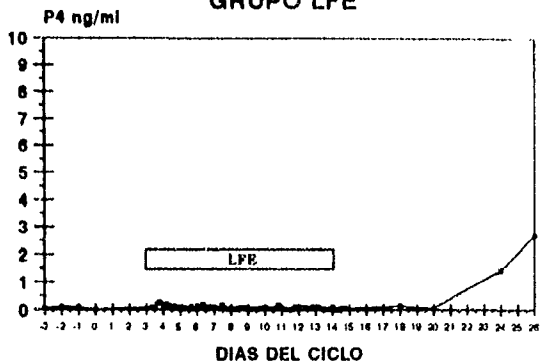
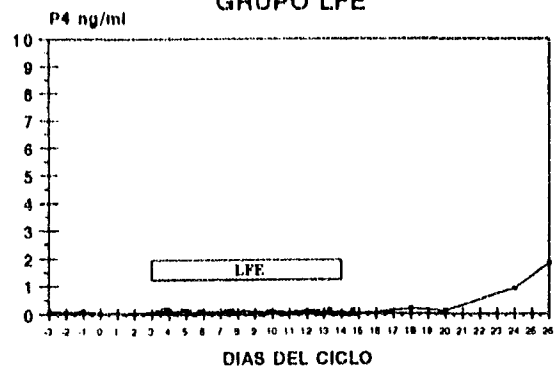


FIGURA 2. Concentraciones plasmáticas de progesterona, en las ovejas del grupo hCG, las cuales fueron inducidas a ovular con 1000 U.I. de hCG. Las 5 ovejas formaron cuerpos lúteos de corta duración que regresaron entre el día 6 y 7 posterior a la aplicación de hCG y fueron seguidos por una segunda ovulación con formación de cuerpos lúteos de duración normal. El día 0 indica el momento en que se administro la hCG. Los cuerpos lúteos de corta duración se indican como CLCD. Los cuerpos lúteos de duración normal se indican como CLN.

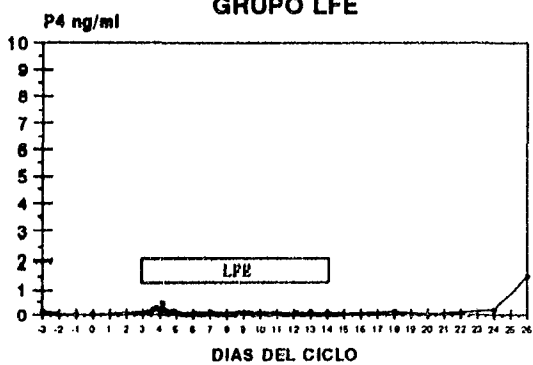
OVEJA # 181
GRUPO LFE



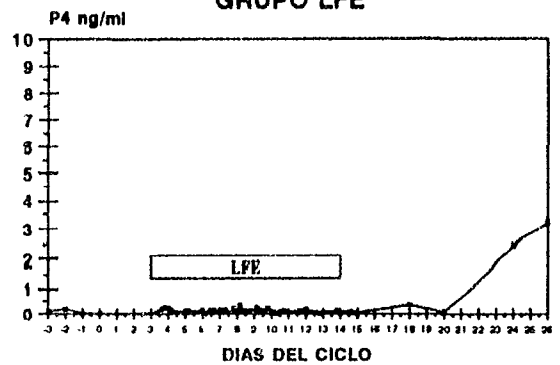
OVEJA # 7223
GRUPO LFE



OVEJA # 7491
GRUPO LFE



OVEJA # 2692
GRUPO LFE



OVEJA # 8086
GRUPO LFE

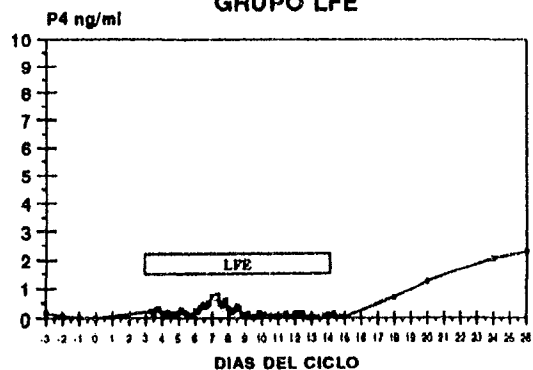
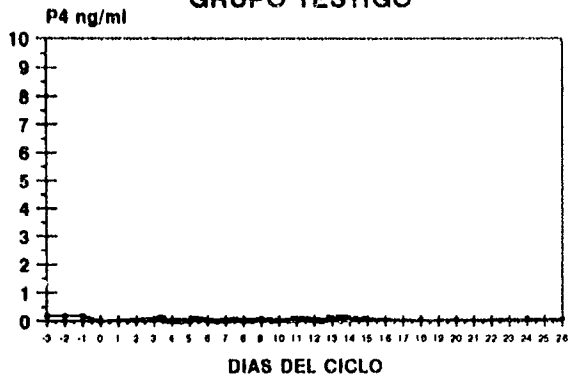
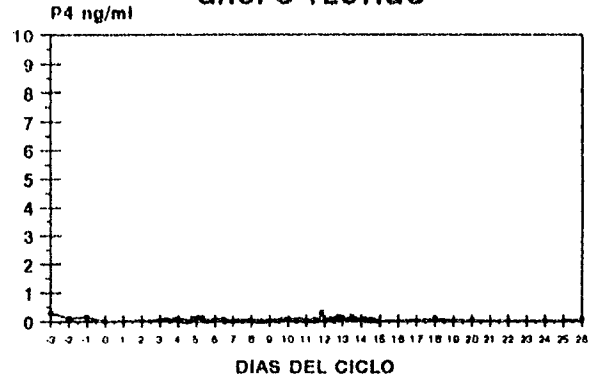


FIGURA 3. Concentraciones plasmáticas de progesterona en 5 ovejas que fueron tratadas con LFE sin ser previamente inducidas a ovular, la administración de líquido folicular no fue acompañada por elevación en las concentraciones de progesterona. Se produjo una elevación en las concentraciones de progesterona entre 8 y 10 días después de suspender la administración de LFE. El día 0 representa el momento en que se aplicó la hCG en los grupos que fueron inducidos a ovular. El período de administración de LFE se indica con una barra.

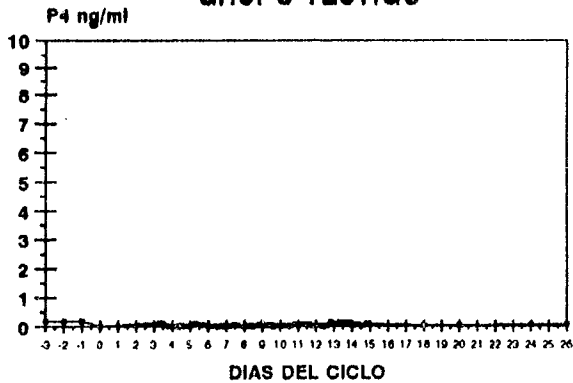
OVEJA # 2592
GRUPO TESTIGO



OVEJA # 61
GRUPO TESTIGO



OVEJA # 105
GRUPO TESTIGO



OVEJA # 161
GRUPO TESTIGO

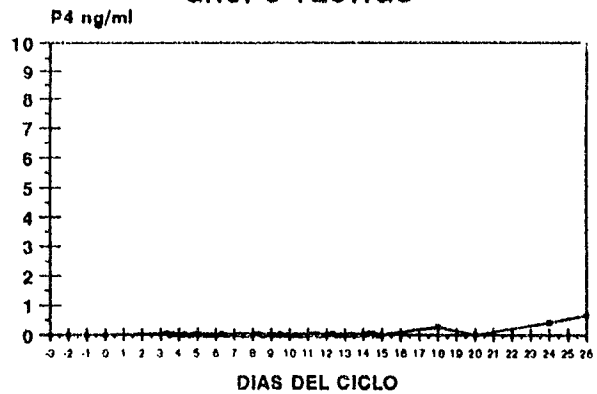


FIGURA 4. Concentraciones plasmáticas de progesterona de 4 ovejas en anestro estacional. Las concentraciones de progesterona se mantuvieron basales durante todo el período de muestreo. El día 0 indica el momento de administración de hCG en los grupos experimentales.

5.2 EFECTO DE LA APLICACION DEL LIQUIDO FOLICULAR EQUINO SOBRE LAS CONCENTRACIONES PROMEDIO DE PROGESTERONA.

En el cuadro 2 se puede observar que en el momento de la aplicación de gonadotropina coriónica humana (hCG) para inducir la ovulación (día cero del ciclo estral), los niveles de progesterona fueron similares en los cuatro grupos de animales del experimento. Sin embargo, se observa que a partir del día 3 las concentraciones de progesterona de las ovejas de los grupos tratados con hCG comenzaron a elevarse más que en los otros grupos. Sin embargo, en el grupo hCG las concentraciones de progesterona regresaron a niveles basales a partir del día 5, mientras las concentraciones de la hormona en el grupo hCG+LFE continuaron elevándose, manteniéndose elevadas hasta el día 14. A partir del día 6 las concentraciones de progesterona fueron significativamente ($p < 0.01$) más elevadas en el grupo hCG+LFE que en los otros 3 grupos, manteniéndose esta diferencia hasta el final del muestreo. En el grupo hCG las concentraciones de progesterona comenzaron a elevarse por segunda vez a partir del día 9, siendo significativamente más elevadas ($p < 0.01$) que las de los grupos LFE y testigo en los días 12, 13 y 14. Las concentraciones de progesterona siempre se mantuvieron basales en los grupos LFE y testigo, no existiendo diferencia entre estos dos grupos en ningún día.

Al comparar el área bajo la curva de progesterona (Figura 5) durante la primera fase lútea se encontró que fue significativamente mayor ($p < 0.01$) para las ovejas del grupo hCG+LFE que para las ovejas del grupo hCG. En las ovejas de los otros dos grupos no hubo fases lúteas, por lo que no se puede realizar la comparación.

CUADRO 2. CONCENTRACION DE PROGESTERONA DE LOS 4 GRUPOS EN DIFERENTES DIAS DEL EXPERIMENTO.

DIA	** hCG+LFE	*** hCG	**** LFE	***** TESTIGO
*				
0	0.1±0.12 ^a	0.1±0.18 ^a	0.1±0.11 ^a	0.1±0.12 ^a
3	0.5±0.16 ^a	0.3±0.18 ^a	0.1±0.18 ^a	0.05±0.23 ^a
4	0.6±0.13 ^a	0.5±0.14 ^a	0.1±0.14 ^a	0.02±0.19 ^a
5	0.7±0.13 ^a	0.3±0.14 ^a	0.08±0.14 ^a	0.04±0.19 ^a
6	1.0±0.13 ^a	0.1±0.14 ^b	0.1±0.14 ^b	0.02±0.19 ^b
7	1.4±0.13 ^a	0.1±0.14 ^b	0.1±0.14 ^b	0.02±0.19 ^b
8	2.0±0.12 ^a	0.2±0.13 ^b	0.1±0.13 ^b	0.01±0.17 ^b
9	1.9±0.14 ^a	0.3±0.16 ^b	0.07±0.16 ^b	0.02±0.20 ^b
10	2.3±0.13 ^a	0.5±0.14 ^b	0.06±0.14 ^b	0.02±0.19 ^b
11	3.0±0.13 ^a	0.8±0.14 ^b	0.05±0.14 ^b	0.04±0.19 ^b
12	4.5±0.13 ^a	1.2±0.14 ^b	0.07±0.14 ^c	0.04±0.19 ^c
13	3.5±0.13 ^a	1.5±0.14 ^b	0.05±0.14 ^c	0.07±0.19 ^c
14	2.5±0.13 ^a	1.6±0.14 ^a	0.04±0.14 ^c	0.04±0.19 ^c

a,b,c Para un determinado día, valores que no comparten literal son significativamente diferentes (p< 0.01).

* Para todos los grupos se consideró como día 0 el día en que se aplicó hCG en los grupos que recibieron dicha hormona.

** hCG+LFE - Ovejas tratadas con 1000 U.I. de hCG en el día 0 y con 3 ml de Líquido Folicular Equino libre de esteroides cada 8 horas desde el día 3 hasta el día 14.

*** hCG - Ovejas tratadas con 1000 U.I. de hCG en el día 0.

**** LFE - Ovejas tratadas con Líquido Folicular Equino libre de esteroides cada 8 horas desde el día 3 hasta el día 14.

***** Testigo - No recibieron tratamiento.

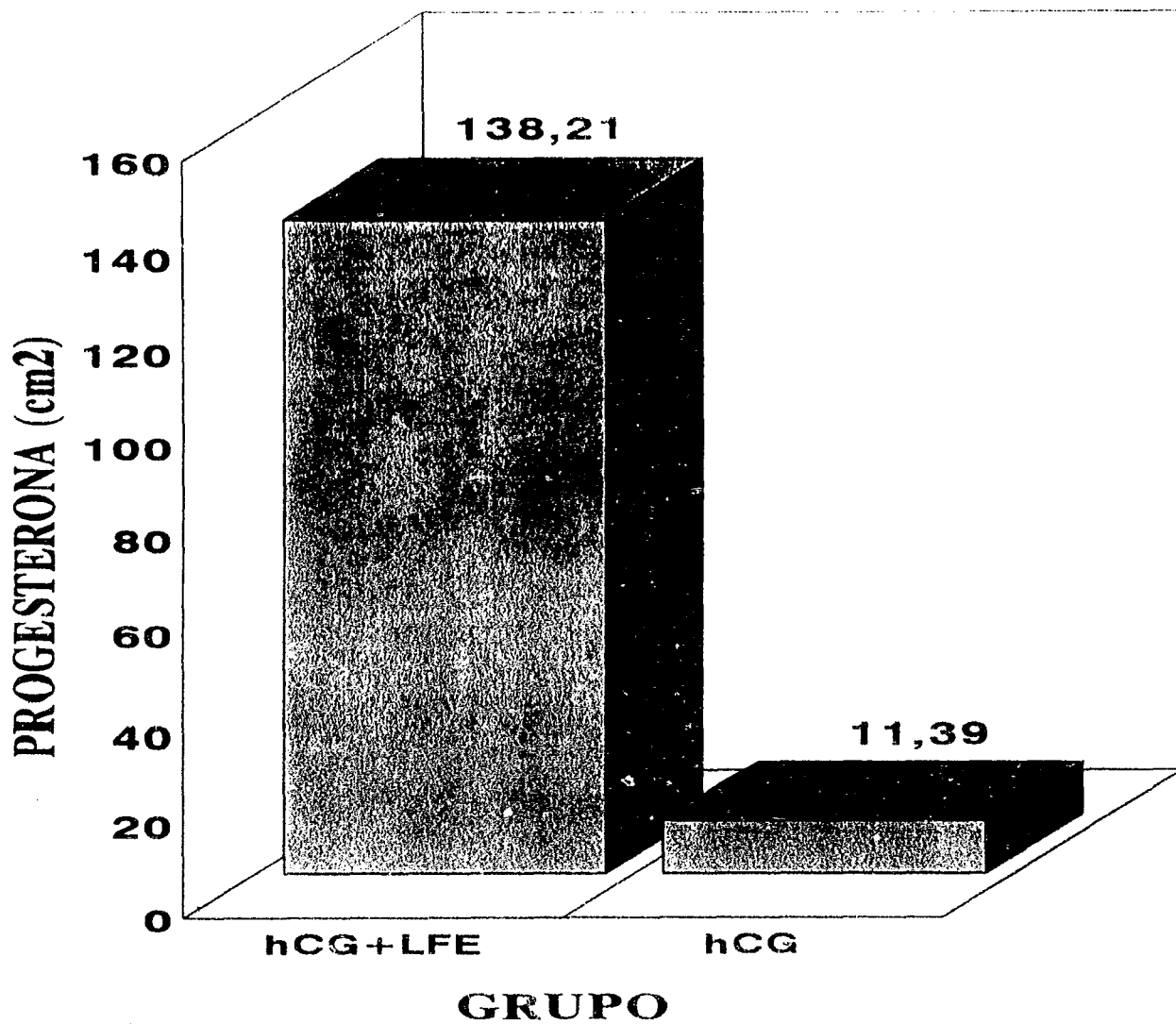


FIGURA 5. Area bajo la curva de progesterona en los grupos de ovejas tratadas con hCG y Líquido Folicular Equino (hCG y hCG+LFE). Las diferencias entre los dos grupos son altamente significativas ($p < 0.01$).

VI DISCUSION.

Al analizar en conjunto a todos los animales, se puede observar que solamente en el grupo hCG+LFE se presentaron cuerpos lúteos normales durante la primera ovulación. En contraste, en el grupo tratado solamente con hCG todas las fases lúteas fueron de corta duración (Figura 2, Cuadro 1), por lo que se confirman los hallazgos de otros autores en el sentido de que la aplicación de hCG en animales en anestro induce en forma repetible la ovulación y la formación de cuerpos lúteos de corta duración (11). Lo anterior concuerda con los resultados de Balcázar (3), quien encontró una incidencia mucho mayor de cuerpos lúteos normales en las ovejas en anestro que recibieron hCG+LFE que en aquellas que sólo se trataron con hCG, lo que confirma que la administración de LFE a este tipo de animales evita la luteólisis prematura (3), lo que posiblemente se deba a que se modifica el patrón de secreción pulsátil de $\text{PGF2}\alpha$ (24).

En el presente trabajo se pudo observar que al momento de la aplicación de hCG (Cuadro 2) no existían diferencias significativas en las concentraciones de progesterona entre los animales que formaron los 4 grupos experimentales. Sin embargo, desde el día 3 del ciclo las concentraciones de progesterona de las ovejas del grupo hCG+LFE comenzaron a elevarse más que en el grupo hCG. Esta elevación de progesterona coincidió con la primera aplicación de LFE, y a partir del día 7 las concentraciones fueron estadísticamente diferentes en ambos grupos ($p < 0.01$). El LFE corrigió la función lútea de tal forma que los perfiles de progesterona fueron similares e incluso mayores a los que se obtienen cuando se usan pretratamientos con progestágenos antes de la inducción de la ovulación con GnRH o hCG, lo que se conoce que resulta en la formación de cuerpos lúteos normales (26,27,41). Es probable entonces que además de su efecto bloqueador de la secreción de $\text{PGF2}\alpha$ (24), el LFE estimule a las células lúteas para que produzcan más progesterona a través de un efecto sobre la secreción de LH, ya que anteriormente Hunter et al (26), Mcleod y McNeilly (43) encontraron que el líquido folicular bovino incrementaba las concentraciones y la frecuencia de secreción de LH en ovejas en anestro inducidas a ovular. Sin embargo, Wallace y McNeilly (60), Larson et al (32) y Beard y Hunter (5) mencionan que el líquido folicular bovino no tiene

ningún efecto estimulante sobre la función lútea ni sobre las concentraciones de progesterona en ovejas.

Es importante mencionar que en un trabajo anterior realizado por McLeod y McNeilly (42) en el cual se aplicaba un pretratamiento con progestágenos a ovejas inducidas a ovular con GnRH, el cuerpo lúteo se mantenía funcional por 12 días, comenzando a elevarse la progesterona a partir del día 4 del ciclo estral, lo que es similar a lo encontrado en el grupo hCG+LFE de este trabajo.

En otro trabajo realizado por Beard y Hunter (5) en ovejas anéstricas inducidas a ovular con GnRH, y tratadas con líquido folicular bovino, las ovejas no tratadas con líquido folicular bovino presentaban una anormal función lútea y en las ovejas tratadas con líquido este prolongaba la funcionalidad del cuerpo lúteo, pero no mencionan cuanto tiempo exactamente duró la función lútea en cada grupo, ni cuales fueron las concentraciones promedio de progesterona.

En este trabajo se pudo demostrar que el origen de la elevación de los niveles de progesterona en las ovejas inducidas a ovular con hCG y tratadas con LFE son dependientes de un cuerpo lúteo y no de algún otro tejido, y además indica que al evitar la luteólisis prematura, este cuerpo lúteo puede completar su período normal de funcionalidad.

Además de que el LFE es rico en inhibina, por lo que puede evitar la regresión prematura de los cuerpos lúteos mediante la supresión de la secreción de FSH y del desarrollo folicular, existen LFE muchas otras sustancias que podrían estar estimulando a las células lúteas para producir progesterona por medio de alguna vía enzimática y/o de la activación del RNAm que acelere la esteroidogénesis en las células lúteas pequeñas o la producción de progesterona independiente a LH de las células lúteas grandes(19).

VII CONCLUSIONES

El líquido folicular es capaz de estimular la función lútea y alargar la vida de los cuerpos lúteos provocando una elevación de las concentraciones de progesterona en ovejas inducidas a ovular con hCG.

La elevación de las concentraciones de progesterona no se debe a que el líquido folicular equino contenga progesterona o estimule su producción en algún tejido diferente al cuerpo lúteo ya que no se produce en ausencia de este último.

VIII LITERATURA CITADA

1. 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. Fertil. Suppl.* 43:125-138 (1991).
2. Balcázar, J.A.: Efecto de la suplementación alimenticia sobre la eficiencia reproductiva de corderas pelibuey inducidas a la pubertad con acetato de melengestrol. Tesis de Licenciatura, Fac. de Med. Vet. y Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México. (1992).
3. Balcázar, J.A.: Efecto de la administración de líquido folicular equino sobre el desarrollo folicular, duración de la fase lútea y fertilidad de ovejas inducidas a ovular mediante la administración de hCG. Tesis de Maestría Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México (1995).
4. Bazer, F.W., Ott, T.L., and Spencer, T.E.: Pregnancy recognition in ruminants, pigs and horses; signals from the trophoblast. *Theriogenology* 41:79-94 (1994).
5. Beard, A.P. and Hunter, M.G. : Effects of bovin follicular fluid and exogenous oestradiol on the GnRH-induced short luteal phase in anoestrous ewes. *J. *Reprod. Fertil.* 100:211-217 (1994).*
6. Braden, T.D. and Niswender, G.D.: Differential loss of the two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum following prostaglandins (PG)F₂ α . *Biol. *Reprod.* 30(suppl):14(abst) (1985).*
7. Campbell, B.K., Pieton, H.M., Mann, G.E., McNeilly, A.S. and Baird, D.T.: Effect of steroid and inhibin free ovine follicular fluid on ovarian follicles and ovarian hormone secretion. *J. *Reprod. Fertil.* 93:81-96 (1991).*
8. Cooper, D.A., Carver, D.A. Villeneuve, P., Silvia, W.J., and Inskip, 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. Fertil.* 91:411-421 (1991).*
9. 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 F₂ α on lifespan and progesterone secretion of short-lived corpora lutea. *J. *Reprod. Fertil.* 87:199-207 (1989).*
10. Diekman M.A., O'Callaghan, P., Nett, T.M. and Niswender, G.D.: Effect of prostaglandin F₂ α on the number of LH receptors in ovine corpora lutea. *Biol. *Reprod.* 19:1010-1013 (1978).*
11. Driancourt, M.A., Bodin, L., Boमारov, 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).*

12. Findlay, J.K., Tsonis, C.G., Staples, L.D. and Chaill, N.P.: Inhibin secretion by the sheep ovary. J. Reprod. Fertil. 76:751-761 (1986).
13. Findlay, J.K., Clarke, I.J., Luck, M.R. and Rodgers R.J.: Peripheral and intragonadal actions of inhibin-related peptides. J. Reprod. Fertil. Suppl. 43:139-150 (1991).
14. Findlay, J.K.: An update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis. Biol. Reprod. 48:15-23 (1993).
15. Fitz, T.A., Mayan M.H., Sawyer, H.R. and Niswender, G.D.: Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. Biol. Reprod. 27:703-711 (1982).
16. 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).
17. Flower, R.J. and Blackwell, G.J.: The importance of phospholipase-A2 in prostaglandin biosynthesis. Biochem Pharmacol 25:285 (1976).
18. Garverick, H.A., Zollers, W.G. and Smith, M.F. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. Anim. Reprod. Sci. 28:111-124 (1992).
19. Gil, T.J. Reproductive Immunology and Immunogenetics. en : Knobil, E and Neill, J.D. The Physiology of Reproduction. Raven Press N.Y. pp. 798-799 (1994).
20. Granstrom, E. : Prostaglandin Chemistry. Acta. Vet. Scand. suppl. 77:1-4 (1981)
21. Hawkins, D.E., Belfiore, C.J. and Niswender, G.D.: Regulation of mRNA encoding 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase isomerase (3 β -HSD) in the ovine corpus luteum. Biol. Reprod. 48:185-1190 (1993).
22. 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. Fertil. 72:1-8 (1984).
23. 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. Fertil. 76:623-635 (1986).

24. Hernández, C.J., Kindahl, H., Balcázar, A., Valencia, M.J. y Zarco, Q.L.: Secreción de la Prostaglandina F₂ α en ovejas con fases luteas cortas tratadas con líquido folicular equino libre de esteroides. Memorias de la Reunion Nacional de Investigación Pecuaria, México, D.F. 341 (1995).
25. Hunter, M.G., Southee, J.A., McLeod, B.J. and Haresing, W.: Progesterone pretreatment has a direct effect on GnRH-induced preovulatory follicles to determine their ability to develop into normal corpora lutea in anoestrous ewes. J. Reprod. Fertil. 76:349-363 (1986).
26. Hunter, M.G., Southee, J.A. and Lamming, G.E.: Function of abnormal corpora lutea in vitro after GnRH-induced ovulation in anoestrous ewes. J. Reprod. Fertil., 84:139-148 (1988).
27. Hunter, M.G., Ayad, V.J. Gilbert, C.L. Southee, J.A. and Wathes, D.C.: Role of prostaglandin F₂ α and oxytocin in the regression of GnRH-induced abnormal corpora lutea in aneestrous ewes. J. Reprod. Fert., 85:551-561 (1989).
28. Hunter, M.G. : Characteristics and causes of inadequate corpus luteum. J. Reprod. Fertil. Suppl. 43:91-99 (1991).
29. Knight, P.G.: Identification and purification of inhibin and inhibin-related proteins. J. Reprod. Fertil. Suppl. 43:111-123 (1991).
30. Kretser, D.M. and Robertson, D.M.: The isolation and physiology of inhibin and related proteins. Biol. Reprod. 40:33-47 (1989).
31. Lamming, J.L., Vallet, J.L. and Flint, A.P.F.: Progestational control of endometrial oxytocin receptor determines cycle length in sheep. J. Reprod. Fertil. Suppl. 43:53-54 (1991).
32. Larson, G.H., Mallory, D.S., Dailey, R.A. and Lewis, P.E.: Gonadotropins concentrations, follicular development, and luteal function in pituitary stalk-transected ewes treated with bovine follicular fluid. J. Anim. Sci., 69:410-411 (1991).
33. Lau, T.M., Gow, C.B. and Fairclough, R.J.: Increases in the oxytocin-induced prostaglandin F₂ α response and reduction in the concentrations of endometrial oxytocin receptors in ewes in response to progesterone. J. Reprod. Fertil. 95:11-18 (1992).
34. Lussier, J.G. : Modulation of ovarian follicular development in cattle by gonadotrophins and bovine follicular fluid. Thesis for the Degree of Doctor Philosophy in the Department of Veterinary Physiological Sciences. University of Saskatchewan. (1989).
35. 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).

36. 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 (1992).
37. Martin, G.B., Price, C.A., Thiery, J.C. and Webb, R.: Interaction between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotrophins in the ewe. J. Reprod. Fertil. 82:319-328 (1988).
38. McCracken, J.A., Schams, W. and Okulicz, W.C.: Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF₂ α from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation during early pregnancy. Anim. Reprod. Sci. 7:31-55 (1984).
39. McGuire, W.J., Hawkins, D.E. and Niswender, G.D.: Activation of protein kinase (PK)-C inhibits progesterone production in vivo. Biol. Reprod. 46(suppl):84(abst) (1992).
40. McLeod, B.J., Haresing, W. and Lamming, G.E. : Responses of seasonally anoestrus ewes to small-dose multiple injection of GnRH without progesterone pre- treatment. J. Reprod. Fertil. 65:223-230 (1982).
41. McLeod , B.J., Haresing, W. and Lamming, G.E. : The induction of ovulation and luteal function in seasonally anoestrus ewes treated with small-dose multiple injection of GnRH. J. Reprod. Fertil. 65:215-221 (1982).
42. McLeod, B.J. and MacNelly, A.S.: Suppression of plasma FSH concentrations with bovine follicular fluid blocks ovulation in GnRH-treated seasonally anoestrous ewes. J. Reprod. Fertil. 81:187-194 (1987).
43. McLeod, B.J and McNeilly, A.S.: Manipulation of plasma FSH concentrations by administration of bff affects LH secretion in seasonally anoestrous ewes. Anim. Reprod. Sci. 25:115-124 (1991).
44. 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 (1989).
45. Mejía, V.O.: Efecto del líquido folículo equino en la sobrevivencia de embriones ovinos transferidos asincrónicamente. Tesis de Maestría. Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. México. (1995).
46. Miller, K.F., Crister, 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 (1979).
47. 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 (1979).

48. Miquelajáuregui, M.E.: Efecto de la inhibina o flunixin-meglumine (FINADINE) sobre la luteólisis en ovejas. Tesis de Licenciatura. Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. México. (1993).
49. Neter, J. and Wasserman, W. Applied Linear Statistical Models. Richard D. Irwin, Inc. (1974).
50. O'Shea, J.D., Rodgers, R.J. and Wrigte, P.J.: Morphometric analysis and function in vivo and in vitro of corpora lutea from ewes treated with LHRH during seasonal anestrous. J. Reprod. Fertil. 72:75-85 (1984).
51. Roser, J.F., McCue, P.M. and Hoye, E.: Inhibin activity in the mare and stallion. Domestic. Anim. Endocrinology. 11:87-100 (1994).
52. Samuelsson, B: Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation, Science. 220:568 (1983).
53. 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).
54. Silvia, W.J., Lewis, G.S., McCracken, J.A., Thatcher, W.W. and Wilson, Jr., L.: Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F₂ α during luteolysis in ruminants. Biol. Reprod. 45:655-663 (1991).
55. Silvia, W.J. y Raw, R.E.: Regulation of pulsatile secretion of prostaglandin F₂ α from the ovine uterus by ovarian steroids. J. Reprod. Fertil. 98:341-347 (1993).
56. 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. Fertil. 84:131-137 (1988).
57. Southee, J.A., Hunter, M.G., Law, A.S. and Haresing, W. : Effect of hysterectomy on the short life-cycle corpus luteum produced after GnRH-induced ovulation in the anoestrous ewe. J. Reprod. Fertil. 84:149-155 (1988).
58. Srikandakumar, A., Ingraham, R.H., Ellsworth, M., Archbald, L.F., Liao, A. and Godke, R.A.: Comparison of a solid-phase, no-extraction radioimmunoassay for progesterone with an extraction assay for monitoring luteal function in the mare, bitch and cow. Theriogenology. 26:779-793 (1986).
59. 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. Fertil. 90:625-634 (1990).

60. 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).
61. Zarco, L., Stabenfeldt, G.H., Kindahl, H., Quirke, J.F. and Granstrom, E.: Persistence of luteal activity in the non-pregnant ewe. Anim. Reprod. Sci. 7:245-267 (1984).
62. Zarco, L., Stabenfeldt, G.H., Quirke, J.F., Kindahl, H. and Bradford, G.E.: Release of prostaglandin F-2 α and timing of events associated with luteolysis in ewes with oestrous cycles of different lengths. J. Reprod. Fertil. 83:517-526 (1988).
63. Zarco, L., Stabenfeldt, G.H., Basu, S., Bradford, G.E. and Kindahl, H.: Modification of prostaglandin F2 α synthesis and release in the ewe during the initial establishment of pregnancy. J. Reprod. Fertil. 83:527-536 (1988).
64. Zollers, Jr., W.G., Garverick, H.A. and Smith, M.F.: Oxytocin induced release of prostaglandin F2 α in post-partum beef cows; comparison of short versus normal luteal phases. Biol. Reprod. 41:262-267 (1989).