

01684



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

1  
20j

CONTROL DE LA LONGITUD DE LA FASE LUTEA EN OVEJAS  
MEDIANTE LA ADMINISTRACION DE LIQUIDO FOLICULAR  
EQUINO LIBRE DE ESTEROIDES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

*(Reproducción Animal)*

P R E S E N T A :

Joel Hernández Cerón

ASESORES: Dr. LUIS ZARCO QUINTERO  
Dr. JAVIER VALENCIA MENDEZ

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

Esta tesis está dedicada a mi esposa Elvia y a nuestros  
pequeños tiranos: Marco Antonio y Adriana Omara.

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis y el autor deben mucho al Dr. Luis Zarco Quintero por el apoyo recibido, no solo durante la realización de los estudios de doctorado sino desde el momento en que me dio la oportunidad de trabajar en su grupo.

Doy gracias al Dr. Javier Valencia Méndez por su dirección y apoyo.

Expreso mi reconocimiento y gratitud a los integrantes del Comité Tutorial de Grado:

Dr. Carlos Galina Hidalgo  
Dr. Rodolfo Rodríguez Maltos  
MSc. Ivette Rubio Gutiérrez  
MSc Arturo Trejo González  
Dr. Victor Fuentes Hernández  
Dr. Luis Zarco Quintero  
Dr. Javier Valencia Méndez

Agradezco a la MVZ Clara Murcia y MVZ Susana Rojas por el trabajo invertido en las determinaciones hormonales y a Mariana Bernal por su colaboración en todo momento.

Doy gracias al Dr. Hans Kindahl del Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas por su ayuda en la determinación de las concentraciones del metabolito de la PGF<sub>2α</sub>.

A todos mis compañeros de trabajo del Departamento de Reproducción doy gracias por su colaboración y amistad.

Agradezco a los académicos y trabajadores del Centro de Enseñanza Práctica, Investigación y Extensión en Rumiantes (CEPIER) su apoyo en el cuidado de las ovejas.

Expreso mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo financiero del Programa de Apoyo a la Investigación de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, y del Programa de Apoyo a Tesis Doctorales de la Coordinación General de Posgrado (PADEP, proyecto 016301).

## LISTA DE CONTENIDO

### CAPITULO

I.	INTRODUCCION GENERAL	1
II	REVISION DE LA LITERATURA	5
III	EFFECTO DEL LIQUIDO FOLICULAR EQUINO LIBRE DE ESTEROIDES SOBRE LA SECRECION DE FSH EN OVEJAS EN ANESTRO ESTACIONAL Y LA PRESENTACION DEL ESTRO INDUCIDO CON PGF2 $\alpha$ EN OVEJAS CICLANDO	36
	Resumen	36
	Introducción	37
	Material y Métodos	38
	Resultados	41
	Discusión	42
IV	EFFECTO DEL LIQUIDO FOLICULAR EQUINO LIBRE DE ESTEROIDES SOBRE LA SECRECION DE FSH, DESARROLLO FOLICULAR, PRODUCCION DE ESTRADIOL, SECRECION DE PGF2 $\alpha$ Y DURACION DE LA FASE LUTEA EN OVEJAS EN DIESTRO	45
	Resumen	45
	Introducción	46
	Material y Métodos	48
	Resultados	51
	Discusión	56
V	SECRECION DE LA PROSTAGLANDINA F2 $\alpha$ EN OVEJAS CON FASES LUTEAS CORTAS TRATADAS CON LIQUIDO FOLICULAR EQUINO LIBRE DE ESTEROIDES	60
	Resumen	60
	Introducción	61
	Material y Métodos	62
	Resultados	64
	Discusión	71
VI	DISCUSION GENERAL	74
VII	LITERATURA CITADA	79

## RESUMEN

HERNANDEZ CERON JOEL. CONTROL DE LA LONGITUD DE LA FASE LUTEA EN OVEJAS MEDIANTE LA ADMINISTRACION DE LIQUIDO FOLICULAR EQUINO LIBRE DE ESTEROIDES. (DIRECTORES DE TESIS DR. LUIS ZARCO QUINTERO Y DR. JAVIER VALENCIA MENDEZ).

Se realizaron tres experimentos con el objetivo de evaluar si el tratamiento con líquido folicular equino libre de esteroides (LFE) en ovejas es capaz de suprimir la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH), el crecimiento folicular, la producción de estradiol, y con ello modificar la secreción de la prostaglandina  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ) y retrasar la regresión del cuerpo lúteo tanto de ovejas ciclando como de aquellas que desarrollan cuerpos lúteos de vida corta después de ser inducidas a ovular en la época de anestro.

En el primer experimento se evaluó si el LFE suprime la secreción de FSH en ovejas en anestro estacional, y si retrasa la presentación del estro inducido con prostaglandina  $F2\alpha$  en ovejas cíclicas. En la primera parte de este experimento se formaron dos grupos de ovejas en anestro estacional. El grupo tratado ( $n=10$ ) recibió por vía endovenosa 3 ml de LFE cada 8 h durante 5 días. El LFE se trató previamente con carbón-dextrán, lo que permitió remover más del 99 % del estradiol y la progesterona presentes originalmente. El grupo testigo ( $n=9$ ) recibió solución salina fisiológica (SSF) en lugar de LFE. En muestras sanguíneas obtenidas cada 4 h se determinaron las concentraciones de FSH. En la segunda parte de este experimento se utilizaron 22 ovejas adultas ciclando, previamente sincronizadas. En el día 11 del ciclo subsecuente al estro sincronizado todas las ovejas fueron tratadas con 15 mg de  $PGF2\alpha$ , y se dividieron en 2 grupos. El grupo tratado ( $n=11$ ) recibió por vía endovenosa 3 ml de LFE cada 8 horas por 72 horas a partir de la aplicación de la  $PGF2\alpha$ . El grupo testigo ( $n=11$ ) recibió SSF en lugar de LFE. Se detectaron estros 3 veces al día utilizando un macho con mandil y se consideró el inicio del estro cuando la hembra aceptó la monta por primera vez. Las concentraciones de FSH fueron significativamente menores ( $P < 0.05$ ) en las ovejas tratadas con LFE. El intervalo de la administración de  $PGF2\alpha$  a la presentación del estro fue

significativamente mayor en las ovejas que recibieron LFE ( $131 \pm 9.9$  h) que en las del grupo testigo ( $44 \pm 3.9$  h).

En el segundo experimento se evaluó el efecto de la administración del LFE durante el diestro tardío sobre la secreción de FSH, el desarrollo folicular, la concentración de estradiol y la longitud de la fase lútea de la oveja. Se utilizaron 41 ovejas adultas previamente sincronizadas. En el día 11 del ciclo subsecuente al estro sincronizado se formaron 2 grupos. El grupo tratado ( $n=24$ ) recibió por vía endovenosa 3 ml de LFE cada 8 h durante 10 días o hasta la presentación del estro. El grupo testigo ( $n=17$ ) recibió SSF en lugar de LFE. En muestras sanguíneas tomadas diariamente se determinaron las concentraciones de progesterona. En 5 ovejas de cada grupo se determinaron las concentraciones de FSH en muestras obtenidas cada 2 h. Además, en dos ovejas del grupo tratado en las que se retrasó la regresión del cuerpo lúteo y en dos del grupo testigo con regresión normal del cuerpo lúteo, se determinaron las concentraciones del metabolito de la  $PGF2\alpha$  (15-ceto-13-14-dihidro- $PGF2\alpha$ ). En el día 14 del ciclo, 8 ovejas del grupo tratado y 7 del testigo fueron ovariectomizadas; se midieron los folículos visibles y se determinaron las concentraciones de estradiol en el líquido folicular de los folículos más grandes. Tanto la longitud de la fase lútea como la longitud del ciclo estral fueron mayores ( $P < 0.05$ ) en las ovejas del grupo tratado ( $13.5 \pm 0.53$  y  $19.5 \pm 0.66$  días respectivamente) que en las del grupo testigo ( $12.2 \pm 0.32$  y  $17.7 \pm 0.26$  días). El diámetro de los folículos y la concentración de estradiol en el líquido folicular, fueron significativamente menores ( $P < 0.05$ ) en el grupo tratado ( $2.62 \pm 0.14$  mm;  $4.35 \pm 2.3$  ng/ml), que en el testigo ( $3.42 \pm 0.20$  mm;  $34.8 \pm 12.15$  ng/ml). En las cuatro ovejas se observó un patrón de secreción pulsátil de la  $PGF2\alpha$  entre los días 15 y 16 del ciclo, sin embargo en las ovejas en las que se alargó la fase lútea la frecuencia promedio de los pulsos fue de  $14.6 \pm 1.08$  h mientras que en las ovejas con regresión normal los pulsos ocurrieron cada  $8 \pm 1.06$  h en promedio (media  $\pm$  error estandar).

El tercer experimento tuvo como objetivo determinar si el tratamiento con LFE evita la regresión prematura del cuerpo lúteo mediante la modificación de la secreción de

prostaglandina  $F2\alpha$ . Para ello, se provocó la ovulación en 12 ovejas en anestro estacional mediante la administración intramuscular de 1000 UI de hCG. A 5 de las ovejas se les administraron por vía endovenosa 3 ml de LFE cada 8 horas durante diez días, comenzando 3 días después de la aplicación de hCG. Las 7 ovejas restantes formaron el grupo testigo y recibieron SSF en lugar de LFE. A partir del día 4 se obtuvieron muestras de sangre de todas las ovejas cada 2 horas durante 5 días para la determinación de las concentraciones del metabolito de la  $PGF2\alpha$  (15-ceto-13,14 dihidro  $PGF2\alpha$ ). En 5 ovejas de cada grupo se determinaron las concentraciones de FSH del día 3 al 6 en muestras tomadas cada 4 horas. Además, en 3 muestras al día se determinaron las concentraciones de progesterona. Las 5 ovejas del grupo tratado con LFE tuvieron cuerpos lúteos de duración normal ( $11.8 \pm 0.9$  días) y las 7 ovejas del grupo testigo presentaron cuerpos lúteos de corta duración ( $3.4 \pm 0.2$  días). Se calculó el número promedio de pulsos de  $PGF2\alpha$  y el intervalo entre cada uno de ellos durante los días 4 y 5. Las concentraciones de FSH fueron significativamente menores ( $P < 0.05$ ) en las ovejas que recibieron LFE en comparación a las del grupo testigo. No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) en el número de pulsos de  $PGF2\alpha$  entre las ovejas tratadas con LFE y aquellas con regresión prematura del cuerpo lúteo ( $3.8 \pm 0.4$  y  $4.7 \pm 0.5$ , respectivamente), sin embargo, existieron diferencias ( $P < 0.05$ ) en el intervalo entre los pulsos; las ovejas tratadas con LFE tuvieron un intervalo entre pulsos de  $16.2 \pm 1.2$  horas, mientras que en las ovejas con regresión prematura el intervalo fue de  $8.0 \pm 0.9$  horas.

Se concluye que el tratamiento con LFE suprime las concentraciones de FSH en ovejas en anestro estacional y retrasa la presentación del estro inducido con  $PGF2\alpha$  en ovejas cíclicas. El tratamiento con LFE durante el diestro suprimió la secreción de FSH, el crecimiento folicular, la producción de estradiol y retrasó la regresión del cuerpo lúteo. Finalmente, la regresión prematura de los cuerpos lúteos de ovejas inducidas a ovular durante la época de anestro estacional es provocada por la secreción pulsátil de  $PGF2\alpha$ , y el tratamiento con LFE altera la frecuencia de secreción de la  $PGF2\alpha$ , lo que evita la regresión prematura del cuerpo lúteo.



## CAPITULO I

### INTRODUCCION GENERAL

La oveja es una especie que presenta su actividad estral cuando los días son más cortos (Malpaux *et al.*, 1989). Una vez que la oveja inicia su actividad ovárica los ciclos estrales se suceden a intervalos de 16 a 18 días, y sólo son interrumpidos por la gestación o por la llegada de la siguiente época de anestro. El estro dura en promedio 36 h y la ovulación sucede 6 h antes de finalizar el estro (Hanrahan y Quirke, 1975). Después de la ovulación el espacio previamente ocupado por el folículo ovulatorio es poblado por células de la granulosa y de la teca interna, formando el cuerpo lúteo, que tiene como función principal la secreción de progesterona, hormona fundamental en el establecimiento y mantenimiento de la gestación (Alila y Dowd, 1991). Cuando la gestación no ocurre, el cuerpo lúteo es destruido por efecto de la prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) producida por el endometrio, reiniciándose otro ciclo y con el una nueva oportunidad de lograr una concepción (Zarco *et al.*, 1988a). Existe variación en la longitud del ciclo estral entre individuos (Hanrahan y Quirke, 1975), lo que está estrechamente relacionado con la longitud de la fase lútea. Zarco *et al.*, (1988a) demostraron que la diferencia en la longitud de los ciclos estrales entre ovejas obedece a diferencias en el momento en que comienza la secreción pulsátil de PGF<sub>2</sub> $\alpha$ .

En la oveja se desarrollan cuerpos lúteos de vida corta en la primera ovulación posparto, de la pubertad y de la época reproductiva, así como en las ovulaciones inducidas durante la época de anestro con la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) o con la gonadotropina coriónica humana (hCG) (Hunter, 1991; Garverick *et al.*, 1992). Las características morfológicas, el número de receptores para la hormona luteinizante (LH) y PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , así como la capacidad de secreción de progesterona son similares entre los cuerpos lúteos de vida normal y los de vida corta (Braden *et al.*, 1989a). Existe evidencia de que la regresión prematura de estos cuerpos lúteos obedece a una liberación adelantada de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (Hunter *et al.*, 1989).

El inicio de la luteólisis es controlado por complejas interacciones entre el cuerpo lúteo, los folículos ováricos y el útero (Silvia *et al.*, 1991). El estradiol estimula en el endometrio la producción de enzimas que son indispensables para la síntesis de  $\text{PGF2}\alpha$  (Hixon y Flint, 1987). Además, estimula la síntesis de receptores para oxitocina, con lo cual la oxitocina producida por el cuerpo lúteo puede fijarse a las células del endometrio, lo que estimula la secreción edometrial de  $\text{PGF2}\alpha$  (Flint *et al.*, 1990; Silvia *et al.*, 1991). Los estrógenos desempeñan entonces un papel importante en la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  y consecuentemente en la regresión del cuerpo lúteo. La principal fuente de estradiol son los folículos ováricos, y particularmente el o los folículos dominantes (Baird *et al.*, 1991). Se ha demostrado que tanto en ovejas como en vacas es posible estimular el inicio de la luteólisis mediante la administración de estradiol, y retrasar la luteólisis mediante la eliminación de la fuente de estradiol durante el diestro tardío. La administración de estradiol ocasiona un adelanto de la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  (Hixon y Flint, 1987), mientras la eliminación física de los folículos ováricos alarga la fase lútea (Karsch *et al.*, 1970; Ginther, 1971; Villa-Godoy *et al.*, 1985).

Si se lograra evitar la regresión de los cuerpos lúteos que normalmente presentan regresión prematura (posparto, pubertad, inicio de la época reproductiva y ovulaciones inducidas hormonalmente en la estación de anestro) sería posible utilizar dichos ciclos para gestar a los animales (Hunter, 1991; Bettencourt *et al.*, 1993). Asimismo, el retrasar el inicio de la luteólisis durante un ciclo normal aumentaría la probabilidad de que se establezca la gestación, sobre todo en aquellas hembras en las que los embriones se encuentran retrasados en su desarrollo. En estas hembras la regresión lútea ocurre antes de que los embriones adquieran el desarrollo requerido para promover el reconocimiento materno de la gestación mediante la producción de las proteínas trofoblásticas tipo 1 (Bazer *et al.*, 1991); este es el caso de las vacas sujetas a estres calórico (Putney *et al.*, 1988). También se verían favorecidas las hembras a las cuales se les transfiere un embrión retrasado en relación a la receptora (Mejía, 1995). Bajo estas circunstancias, alargar la fase lútea le proporcionaría más tiempo a los embriones para que

establezcan los mecanismos para el reconocimiento materno de la gestación, lo cual aumentaría la probabilidad de establecer exitosamente la gestación.

Es posible alargar la vida del cuerpo lúteo mediante la administración de inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, tales como indometacina y flunixin-meglumine (Aiumlamai *et al.*, 1990); sin embargo, estas drogas pueden interferir con el establecimiento de la gestación debido a que inhiben la síntesis de prostaglandinas inespecíficamente, y las prostaglandinas son indispensables para la implantación (Gandolfi *et al.*, 1992).

Una alternativa para retrasar el inicio de la luteólisis en rumiantes consiste en la supresión del desarrollo folicular mediante la administración de una fuente rica en inhibina, la cual es una hormona de naturaleza glicoprotéica que se encuentra en concentraciones elevadas en el líquido folicular (Knight, 1991). Esta hormona suprime la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) a nivel hipofisiario, y consecuentemente inhibe el desarrollo folicular (Findlay, 1993; Baird *et al.*, 1991). Se ha demostrado que el líquido folicular bovino es rico en inhibina, por lo que la administración de este fluido previamente tratado para remover hormonas esteroides, resulta en una supresión de la secreción de FSH, del desarrollo folicular y de la producción de estradiol (Miller *et al.*, 1979b; McNeilly, 1984; McLeod y McNeilly, 1987).

Miquelajauregui (1993), en un estudio preliminar en ovejas a las que administró líquido folicular bovino previamente tratado para remover la fracción de hormonas esteroides (LFB), durante los días 10 a 16 del ciclo, logró retrasar la regresión del cuerpo lúteo y alargar el ciclo estral, con lo que abrió la posibilidad de desarrollar un método práctico para el control de la longitud del ciclo estral. Asimismo, en ovejas en anestro estacional Beard y Hunter, (1994) provocaron la ovulación con GnRH y administraron LFB logrando inhibir la regresión prematura del cuerpo lúteo. Sin embargo, no existe mucha disponibilidad de líquido folicular bovino, ya que el folículo de la vaca es relativamente pequeño (15 a 20 mm como máximo), además de que la mayoría de las vacas que llegan al rastro presentan poco desarrollo folicular.

Como alternativa existe la posibilidad de utilizar líquido folicular equino, ya que también es una fuente rica en inhibina (Roser *et al.*, 1994). Balcázar (1995) administró LFE a ovejas en

anestro inducidas a ovular con hCG, logrando inhibir la regresión lútea prematura. En yeguas ovariectomizadas se ha logrado suprimir la secreción de FSH al administrarles líquido folicular equino libre de hormonas esteroides (LFE) (Miller *et al.*, 1979a; Gremmes, 1990). Asimismo, en yeguas tratadas con LFE se ha logrado retrasar el desarrollo folicular, retrasándose la presentación del estro (Bergfelt y Ginther, 1985). Además, los folículos ováricos de las yeguas son grandes (hasta 50 mm) y casi todas las yeguas presentan desarrollo folicular, aún durante el diestro y la gestación (Ginther, 1990). Sin embargo, el LFE no se ha utilizado en rumiantes para provocar el mismo efecto, aunque existe evidencia de que la inhibina tiene una elevada homología entre especies (Knight, 1991).

El primer experimento del presente trabajo fue realizado con el propósito de evaluar si el LFE suprime la secreción de FSH en ovejas en anestro estacional, así como determinar si el LFE retrasa la presentación del estro inducido con PGF2 $\alpha$  en ovejas cíclicas.

El segundo experimento se realizó con el propósito de evaluar el efecto de la administración de LFE durante el diestro tardío sobre la secreción de FSH, el desarrollo folicular, la concentración de estradiol y la longitud de la fase lútea.

El tercer experimento tuvo como objetivo determinar las características de la secreción de PGF2 $\alpha$  en ovejas en anestro estacional inducidas a ovular con hCG y que fueron tratadas con líquido folicular equino libre de esteroides.

## CAPTULO II

### 2.0 REVISION DE LA LITERATURA

#### 2.1 FOLICULOGENESIS EN LA OVEJA

##### 2.1.1 Etapa preantral

La oveja al nacimiento posee más de 200 000 folículos primordiales, de los cuales solamente entre 250 y 1500 iniciarán su crecimiento en algún momento de la vida del animal (Cahill y Mauléon, 1981). El folículo primordial mide 0.03 mm de diámetro y está formado por un ovocito desprovisto de la zona pelúcida y rodeado por una capa de células epiteliales planas (pre-granulosa). Estos folículos carecen de una red de capilares y reciben los nutrientes por difusión (Mariana *et al.*, 1992). En la cordera los folículos primordiales se encuentran distribuidos en toda la corteza ovárica, mientras que en la oveja adulta se localizan con mayor frecuencia en la región más externa (Scaramuzzi *et al.*, 1993).

El crecimiento de un folículo primordial se inicia con la división de las células de la granulosa y la diferenciación del tejido conectivo que rodea al folículo, el cual da origen a la teca interna. El mecanismo que estimula el crecimiento de los folículos primordiales se desconoce, sin embargo se sabe que este desarrollo inicial es independiente del estímulo de la FSH y la LH (Fortune, 1994; Driancourt, 1991). El crecimiento de los folículos durante esta etapa es modulado por factores parácrinos y autócrinos, tales como factores de crecimiento, inhibina, activina y folistatina (Findlay, 1993; Monget y Monniaux, 1995). Asimismo, estos factores están involucrados en la transición de los folículos desde su etapa no dependiente de gonadotropinas hasta la etapa dependiente de gonadotropinas (Lobb y Dorrington, 1992). Conforme el folículo crece, se deposita una capa de glicoproteínas alrededor del ovocito, formando la zona pelúcida. Además, comienza a secretarse líquido que se acumula entre las células de la granulosa, con lo que se inicia la formación del antro. Una vez que el folículo se distiende con líquido, el ovocito permanece fijo a su pared del folículo mediante el *cumulus oophorus*, el cual es un grupo de células derivadas de las células de la granulosa. En este momento el folículo

recibe el nombre de folículo de Graaf (Mariana *et al.*, 1992; Scaramuzzi *et al.*, 1993). La formación del antro ocurre cuando el folículo tiene entre 0.2-0.4 mm de diámetro. Este evento desempeña un papel importante en la fisiología del folículo, ya que el líquido folicular constituye un compartimiento a través del cual las diferentes células se comunican por medio de hormonas y sustancias parácrinas o autócrinas (Campbell *et al.*, 1995).

El crecimiento de los folículos desde su estado preantral hasta la ovulación (> 5 mm de diámetro) es continuo y toma aproximadamente 180 días. Sin embargo, una vez que el folículo alcanza un diámetro de 2 mm solo requiere de 8 a 9 días para alcanzar el tamaño ovulatorio (Cahill y Mauléon, 1981; McNeilly *et al.*, 1984). Únicamente una pequeña proporción de los folículos que comienzan a crecer llegan a ovular, ya que la mayor parte de ellos sufre degeneración, proceso que se conoce como atresia folicular (Scaramuzzi *et al.*, 1993).

#### 2.1.2 Crecimiento y desarrollo de folículos antrales

Driancourt y Fry, (1988) han clasificado el desarrollo folicular de la oveja en dos etapas: La etapa basal y la etapa tónica. La primera comprende el crecimiento del folículo hasta 2 mm de diámetro y es independiente de las gonadotropinas. La etapa tónica abarca el crecimiento del folículo a partir de los 2 mm de diámetro y hasta que el folículo se convierte en preovulatorio. Esta última etapa se presenta en forma de oleadas constituidas por periodos de reclutamiento, selección y dominancia folicular, similares a las observadas en la vaca. Sin embargo, la oveja presenta entre 3 y 5 oleadas foliculares, mientras que en las vacas se observan de 2 a 3 oleadas (Fortune, 1994; Ghinter *et al.*, 1995).

Cada oleada de crecimiento folicular comienza cuando un grupo de folículos antrales ( $\geq 2.5$  mm diámetro) son estimulados a continuar su desarrollo, proceso conocido como reclutamiento (Fortune, 1994). Posteriormente se produce la selección, durante la cual uno o dos folículos continúan creciendo (folículos dominantes), mientras que sus compañeros (folículos subordinados) sufren atresia (Driancourt, 1991). El folículo seleccionado se convierte en dominante mediante la inhibición directa o indirecta de la diferenciación y el crecimiento de sus

compañeros (Campbell *et al.*, 1995). Si el folículo dominante no llega a ovular después de cierto tiempo de ejercer dominancia sufre atresia y se inicia una nueva oleada de desarrollo folicular. El folículo que por azar es dominante en el momento en que ocurre la regresión natural del cuerpo lúteo llegará a convertirse en el folículo ovulatorio (Fortune, 1994).

El folículo seleccionado en cada oleada folicular posee ciertas características que le permiten seguir creciendo y lo preparan para la ovulación. Este folículo se encuentra altamente irrigado y produce grandes cantidades de estradiol, lo cual se debe a un aumento de la capacidad de la teca para responder a la LH produciendo andrógenos, que ocurre simultáneamente a un aumento de la capacidad de las células de la granulosa para aromatizar los andrógenos y convertirlos en estrógenos (Webb y England, 1982). En contraste, los folículos atrésicos pierden su capacidad aromatizante, por lo que producen menos estradiol y se incrementan las concentraciones de progesterona y androstenediona en el líquido folicular (Ireland y Roche, 1983). Frecuentemente se observan folículos que desde el punto de vista morfológico aparentan ser dominantes, sin embargo fisiológicamente están en proceso de atresia; esto significa que existen dos tipos de dominancia, la morfológica y la fisiológica, siendo esta última la de mayor interés al estudiar la dinámica folicular (Fortune, 1994).

Las ondas foliculares no ocurren exclusivamente en las ovejas que se encuentran ciclando, ya que tanto las ovejas gestantes (Beard *et al.*, 1995) como las que están en anestro (Souza *et al.*, 1995) presentan ondas de desarrollo folicular similares a las de las hembras que están ciclando. Por esta razón, tanto en las ovejas gestantes como en animales en anestro generalmente están presentes folículos de tamaño cercano al ovulatorio, de tal forma que si son tratadas con LH pueden ovular y formar un cuerpo lúteo (McLeod *et al.* 1982a; Driancourt *et al.*, 1990).

### 2.1.3 Control hormonal del crecimiento de los folículos antrales

Las gonadotropinas son indispensables para que el folículo se desarrolle y llegue a ovular. La supresión de la secreción de FSH y LH y su posterior administración han demostrado que el

desarrollo de folículos a partir de 2.5 mm hasta su estado preovulatorio es dependiente de estas hormonas (McNeilly y Fraser, 1987). La FSH es necesaria para el inicio de la oleada folicular (Campbell *et al.*, 1991a) mientras que el papel de la LH es particularmente importante en la maduración final del folículo (Campbell *et al.*, 1990). Sin embargo, la supresión de la FSH mediante la administración de la fracción proteica del líquido folicular bovino durante el proestro inhibe el crecimiento del folículo ovulatorio (McLeod y McNeilly, 1987), lo que indica que también esta hormona es necesaria para el crecimiento final del folículo. Por otra parte, la inhibición de la secreción pulsátil de la LH mediante inmunización pasiva, inhibe el efecto estimulador de la FSH (McNeilly *et al.*, 1991). El papel de la LH en la maduración final de los folículos es evidente en las ovejas anéstricas o gestantes, en las que se observa desarrollo folicular estimulado por la FSH, sin embargo, estos folículos nunca llegan a desarrollarse lo suficiente para ovular debido a que no tienen el apoyo proporcionado por la LH (McNeilly *et al.*, 1991).

La capacidad esteroidogénica del folículo es regulada por las gonadotropinas, y la producción de hormonas esteroideas es indispensable para que el folículo se desarrolle. En los folículos se produce 17  $\beta$  estradiol mediante una acción cooperada entre las células de la teca interna y las de la granulosa. Las primeras poseen los sistemas enzimáticos para la producción de andrógenos, cuya síntesis es regulada por la LH. Posteriormente, los andrógenos pasan a las células de la granulosa, donde son transformados en estrógenos por acción de la enzima aromatasa, la cual es controlada por la FSH (Henricks, 1991). Así, las células de la teca interna tienen receptores para la LH, mientras las células de la granulosa inicialmente solo tienen receptores para la FSH, desarrollando receptores para LH al alcanzar cierto grado de maduración. Bajo estas circunstancias la FSH y el estradiol estimulan la formación de receptores para la LH (McNeilly *et al.*, 1991).

La secreción de estradiol ocurre en forma pulsátil, coincidiendo cada pulso con un pulso previo de LH. Durante la fase lútea los pulsos ocurren con baja frecuencia, y en términos globales la concentración de estradiol es baja, mientras que en la fase folicular la



concentración promedio de estradiol se incrementa debido a un aumento en la frecuencia de los pulsos de LH (Baird *et al.*, 1991).

La Hormona Folículo Estimulante es responsable del inicio de la oleada folicular, ya que se ha observado que los incrementos de los niveles de esta hormona están relacionados con el inicio de las oleadas de crecimiento (Campbell *et al.*, 1991a; Ghinter *et al.*, 1995). Entre 18 y 24 h después del pico preovulatorio de gonadotropinas ocurre un segundo pico de FSH, el cual es responsable del inicio de la primera oleada folicular del nuevo ciclo estral (Baird *et al.*, 1991). Este segundo pico de FSH se debe a la desaparición de la retroalimentación negativa dada por el estradiol y la inhibina (Baird *et al.*, 1991). En ovejas y en vacas, cuando este pico de FSH es suprimido mediante la administración de una fuente rica en inhibina, como lo es el líquido folicular bovino, se afecta el inicio de las ondas foliculares (Medhamurthy *et al.*, 1987; Turzillo y Fortune, 1990).

Cuando un folículo se selecciona y se convierte en dominante, las concentraciones circulantes de FSH disminuyen a niveles basales por efecto de la inhibina y el estradiol producidos por dicho folículo dominante (Campbell *et al.*, 1991b; Baird *et al.*, 1991). De esta forma, la concentración de FSH circulante resulta insuficiente para sostener el crecimiento de los folículos subordinados, y estos sufren atresia. Además, el folículo dominante produce factores locales que suprimen el crecimiento de los folículos subordinados, lo que ha quedado demostrado cuando se administra líquido folicular ovino sin esteroides y sin inhibina a ovejas, en las que se observa una inhibición del desarrollo folicular a pesar de no modificarse la secreción de FSH (Campbell *et al.*, 1991c).

En contraste, el folículo dominante continua su desarrollo a pesar de haber bajos niveles de FSH. Esta característica se puede deber a un incremento de la sensibilidad a la FSH, lo que pudiera estar relacionado con la secreción de factores parácrinos y autócrinos (IGF-1, activina, inhibina) que amplifican la acción de la FSH en las células del folículo (Driancourt, 1991; Findlay, 1993). Además, al parecer el folículo que ha alcanzado un cierto grado de desarrollo requiere principalmente LH para seguir creciendo (Campbell *et al.*, 1995). Esta estimulación del

folículo dominante por parte de la LH es facilitada por el aumento de la síntesis de receptores para LH que se produce en las células de la granulosa del folículo dominante (Fortune, 1994).

#### 2.1.4 Participación de la inhibina en el control del desarrollo folicular

La inhibina es una hormona de naturaleza glicoproteica constituida por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) unidas por un puente disulfuro (Knight, 1991). En la oveja se han identificado dos formas moleculares de la inhibina con diferente peso molecular (32000 kD y 67000 kD), siendo la molécula de 32000 kD la forma bioactiva de inhibina predominante (Leversha *et al.*, 1987).

La inhibina ha sido identificada en el líquido folicular de la vaca (Knight *et al.*, 1987), oveja (Leversha *et al.*, 1987), cerda (Taya *et al.*, 1991) y yegua (Roser *et al.*, 1994). La caracterización de esta hormona en cada una de estas especies demuestra que existe una alta homología entre ellas (85% de homología para la subunidad  $\alpha$  y cerca del 100% para la subunidad  $\beta$ ) (Knight, 1991). La inhibina se produce en las células de la granulosa y se encuentra en el líquido folicular en concentraciones elevadas, lo que indica que los folículos antrales son el principal sitio de producción (McNeilly y Baird, 1989; Mann *et al.*, 1992). En el macho también se producen cantidades importantes de inhibina en el testículo, específicamente en las células de Sertoli (Clarke *et al.*, 1991).

La inhibina se secreta en forma pulsátil (McNeilly y Baird, 1989); el mecanismo por el cual se regula su secreción se desconoce, sin embargo pueden participar la LH, FSH, y factores parácrinos y autócrinos (Findlay, 1993). El tratamiento con FSH incrementa la secreción de inhibina en la oveja (Tsonis *et al.*, 1988). Sin embargo, durante la fase folicular la LH puede estar estimulando la secreción de inhibina, ya que durante esta etapa la FSH se encuentra en concentraciones bajas y la inhibina se incrementa. Además, después del pico preovulatorio de LH las concentraciones de inhibina disminuyen (Findlay *et al.*, 1990). No obstante, Campbell *et al.* (1990) encontraron que durante la fase folicular la LH estimula la producción y secreción de estradiol y androstenediona, pero no de inhibina.

La inhibina suprime la producción y secreción de FSH a nivel hipofisiario, lo que se ha demostrado mediante la administración de inhibina purificada a ovejas ovariectomizadas (Findlay *et al.*, 1987) y a vaquillas ovariectomizadas (Beard *et al.*, 1990). La supresión de la secreción de FSH también se ha demostrado administrando a ovejas líquido folicular bovino previamente tratado para remover la fracción de hormonas esteroides (Knight y Castillo, 1988; McNeilly, 1984b; Larson *et al.*, 1991). Durante la fase lútea y la fase folicular la inhibina está inversamente relacionada con las concentraciones plasmáticas de FSH; el efecto de la inhibina es específico sobre la FSH y no modifica la secreción de LH (Findlay *et al.*, 1990).

La inhibina y el estradiol participan en el control de la secreción de la FSH, y en consecuencia en la regulación de la dinámica folicular (Baird *et al.*, 1991). El estradiol es producido por los folículos ováricos, y cerca del 90 % del estradiol circulante es secretado por el folículo dominante. En cambio, la inhibina no es producida solamente por los folículos dominantes, sino que una cantidad relativamente importante de esta hormona es producida por folículos pequeños, y aún por folículos no estrogénicos (Campbell *et al.*, 1991b; Mann *et al.*, 1992). La inhibina y el estradiol actúan en forma sinérgica en la inhibición de la FSH; el efecto logrado cuando se administra una de ellas por separado es menor al alcanzado cuando actúan las dos juntas (Findlay *et al.*, 1992). Durante la fase folicular el estradiol es más importante en la regulación de la FSH que la inhibina, ya que mientras la inhibina se incrementa en forma discreta el estradiol alcanza sus más altas concentraciones (Campbell *et al.*, 1990; Baird *et al.*, 1991). Sin embargo, la inhibina se secreta en forma más constante que el estradiol durante todo el ciclo, ya que su producción no depende solamente de la presencia de un folículo estrogénico, lo cual le permite regular la secreción de FSH en forma global (Baird *et al.*, 1991).

Después del pico preovulatorio de LH y FSH las concentraciones de estradiol y de inhibina disminuyen rápidamente, lo cual permite que se presente el segundo pico de FSH, que estimula el inicio de la primera onda de desarrollo folicular (McNeilly *et al.*, 1992b).

Para estudiar los efectos de la inhibina sobre la fisiología reproductiva de los rumiantes se ha utilizado principalmente la administración de líquido folicular bovino libre de hormonas

esteroides (LFB). Como consecuencia del tratamiento con este líquido, se observa una supresión de la secreción de FSH y del desarrollo folicular, así como un retraso de la presentación del estro inducido con prostaglandina  $F2\alpha$  (Miller *et al.*, 1979b; McNeilly, 1985; Hunter *et al.*, 1988a). Se ha asumido que estos efectos son provocados por la inhibina contenida en el líquido. Sin embargo, Wood *et al.*, (1993) utilizando vaquillas inmunizadas contra inhibina lograron suprimir el crecimiento folicular y retrasaron la presentación del estro inducido con  $PGF2\alpha$ . Además, Law *et al.* (1992) también lograron provocar estos efectos utilizando LFB al cual se le había retirado la fracción de inhibina. Por otra parte, la inmunización de ovejas con LFB parcialmente purificado incrementa la tasa ovulatoria. En algunos casos este efecto está asociado con un incremento en las concentraciones de FSH (Wallace y McNeilly, 1985; Cummins *et al.*, 1986), y en otros no se relaciona con un aumento de la secreción de FSH (Henderson *et al.*, 1984; Al-Obaidi *et al.*, 1987). Lo anterior indica que en la fracción proteica del LFB están presentes compuestos diferentes a la inhibina que regulan el crecimiento folicular y que pueden actuar directamente a nivel ovárico (Campbell *et al.*, 1991c; Baxter *et al.*, 1995).

La activina y la folistatina son hormonas que se producen en el folículo y tienen influencia sobre la secreción de la FSH y el desarrollo folicular (Findlay, 1993). La activina se produce en las células de la granulosa y ha sido aislada del líquido folicular. Está constituida por dos subunidades  $\beta$  similares a las de la inhibina. Los efectos de la activina sobre la secreción de FSH son opuestos a los de la inhibina, ya que estimula la secreción de FSH a nivel hipofisiario (Knight, 1991; Findlay, 1993).

La folistatina es una hormona proteica producida por las células de la granulosa y que ha sido aislada del líquido folicular bovino (Robertson *et al.*, 1987). Poco se sabe acerca de esta hormona, sin embargo se menciona que tiene una actividad parecida a la de la inhibina, a pesar de que estructuralmente es diferente a esta hormona (Findlay, 1993). La folistatina puede participar en la modulación de la secreción de FSH debido a que funciona como proteína ligadora de la activina (Findlay *et al.*, 1992).

### 2.1.5 Control intraovárico del desarrollo folicular

Durante la etapa no dependiente de gonadotropinas los folículos crecen debido a la actividad de factores locales que son producidos por los mismos folículos (Findlay, 1993). Estos factores locales también son indispensables para el desarrollo folicular durante la etapa dependiente de gonadotropinas (Lobb y Dorrington, 1992). El efecto estimulador de las gonadotropinas sobre el desarrollo folicular no se puede explicar sin la participación de factores intraováricos que medien el efecto de éstas hormonas. Así, el efecto de la FSH sobre la diferenciación y proliferación de las células de la granulosa es mediado por factores de crecimiento producidos en el mismo folículo (Campbell *et al.*, 1995).

Los factores de crecimiento se producen en diferentes tejidos y están directamente involucrados en la regulación de la diferenciación y proliferación celular. Los factores de crecimiento se clasifican en distintas familias de acuerdo a su estructura y actividad biológica. Los más importantes en el control del desarrollo folicular son el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1) y el factor de crecimiento de transformación  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (Lobb y Dorrington, 1992).

El efecto de la FSH sobre el desarrollo folicular es potencializado y complementado por el IGF-1 y TGF  $\beta$ , los que estimulan la diferenciación y proliferación de las células de la granulosa e incrementan la esteroidogénesis, estimulando la síntesis de andrógenos y su posterior aromatización (Monget y Monniaux, 1995; Campbell *et al.*, 1995). El EGF y el FGF tienen efectos opuestos, ya que son inhibitorios de la diferenciación celular y suprimen la producción de estradiol (Lobb y Dorrington, 1992).

La inhibina también tiene efectos parácrinos y autócrinos, ya que facilita la producción de andrógenos en respuesta a la LH (Findlay, 1993; Campbell y Webb, 1995). La activina modula negativamente la producción de andrógenos estimulada por la LH y promueve la diferenciación de las células de la granulosa. También la folistatina modula la función de las células de la granulosa debido a sus propiedades ligadoras sobre la activina (Findlay, 1993).

## 2.2 DESARROLLO Y CONTROL DE LA FUNCION DEL CUERPO LUTEO

Después de la regresión del cuerpo lúteo ocasionada por la liberación uterina de la prostaglandina  $F2\alpha$ , uno o dos folículos serán seleccionados y se convertirán en ovulatorios (Scaramuzzi *et al.*, 1993). Eventualmente, la producción de estradiol por estos folículos será suficiente para provocar la liberación masiva de la hormona liberadora de gonadotropinas y el pico preovulatorio de la hormona luteinizante. Así, la concentración de LH aumenta rápidamente hasta alcanzar concentraciones de 100 a 200 ng/ml durante el pico preovulatorio (50 a 100 veces mayores a las basales) y declina posteriormente a niveles basales en las siguientes 12 horas (Karsch *et al.*, 1992). Esta secreción masiva de LH iniciará los cambios necesarios para que el folículo se transforme en un cuerpo lúteo funcional (Smith *et al.*, 1994).

El cuerpo lúteo (CL) es una glándula temporal que se desarrolla a partir del folículo ovulatorio, por lo que su formación es considerada como una continuación de la maduración folicular (Wiltbank y Niswender, 1992).

### 2.2.1 Luteinización

La luteinización consiste en todos los cambios morfológicos, endócrinos y enzimáticos que ocurren en el folículo preovulatorio hasta que este se transforma en un cuerpo lúteo funcional. La luteinización comienza antes de la ovulación en respuesta a la elevación preovulatoria de las gonadotropinas (LH y FSH), siendo la LH la hormona más importante para la ruptura del folículo y su posterior luteinización (Niswender y Nett, 1994). La supresión del pico preovulatorio de LH inhibe la ovulación y la luteinización (Smith *et al.*, 1994), mientras que la administración de LH durante la fase lútea ocasiona la ovulación y desarrollo de un cuerpo lúteo, o bien la luteinización de los folículos (Beck *et al.*, 1995).

La ovulación ocurre en promedio 30 h después del pico preovulatorio de LH, ésta hormona regula los cambios a nivel de las paredes foliculares que conducen a la ruptura folicular (Karsch *et al.*, 1992). Después de la ovulación, el espacio ocupado previamente por el folículo es invadido por fibroblastos, células endoteliales, células de la teca interna y células de la

granulosa. Este cambio es facilitado por la ruptura de la membrana basal que separaba la capa de células de la granulosa (la cual carece de vasos sanguíneos), de la teca interna; así, comienza la formación de una amplia red de capilares que se distribuyen en todo el cuerpo lúteo en formación, y llegan a constituir hasta el 20 % del volumen del cuerpo lúteo maduro. Estos capilares carecen de músculo liso, lo que les confiere la propiedad de mantenerse en máxima vasodilatación para permitir un mayor flujo sanguíneo (Wiltbank *et al.*, 1990). Durante la fase lútea media, entre el 65 y el 95 % del flujo sanguíneo ovárico pasa por el CL, y aproximadamente el 60 % de la membrana plasmática de las células esteroidogénicas está en contacto con los capilares (Niswender *et al.*, 1976; Wiltbank *et al.*, 1988). Estas características convierten al CL en el órgano con mayor circulación sanguínea en proporción a su tamaño, y esta cualidad favorece su función, permitiendo un aporte continuo y abundante de sustratos y hormonas necesarias para la síntesis de progesterona (Wiltbank *et al.*, 1994).

La luteinización también involucra cambios ultraestructurales de las células de la granulosa y de la teca interna. En ambos tipos celulares se observa un aumento en el desarrollo del retículo endoplásmico liso y del aparato de Golgi, así como un incremento en el número de mitocondrias. En el CL en formación comienzan a distinguirse dos tipos celulares, las células lúteas chicas y las células lúteas grandes. Las primeras comienzan a almacenar gotas de lípidos en el citoplasma, mientras que en las células grandes estas gotas son escasas (Smith *et al.*, 1994). En las células grandes se desarrolla el retículo endoplásmico rugoso lo que les confiere la capacidad para producir oxitocina (Sawyer *et al.*, 1986).

Bioquímicamente se observa que después del pico de LH la producción de androstenediona y  $17\beta$  estradiol disminuyen, y en contraste comienza a incrementarse la síntesis de progesterona. Estos cambios obedecen a los efectos inhibitorios de la elevación preovulatoria de LH sobre la síntesis de las enzimas  $17\alpha$  hidroxilasa y aromatasa. La primera participa en la producción de andrógenos por las células de la teca interna y la segunda transforma estos andrógenos en estrógenos (Voss y Fortune, 1993).

Como se mencionó anteriormente, las células esteroideogénicas del cuerpo lúteo han sido clasificadas de acuerdo a su tamaño en células chicas y células grandes; pero las diferencias entre estos dos tipos celulares van más allá de diferencias en tamaño, ya que también tienen diferencias ultraestructurales, en la regulación de su función, en la presencia o no de receptores para LH y  $\text{PGF2}\alpha$ , y en sus productos de secreción (O'Shea *et al.*, 1986). El origen de estas células se ha estudiado mediante métodos morfológicos e inmunológicos. De esta forma, se conoce que durante la luteinización las células de la teca interna y de la granulosa migran y se distribuyen en la cavidad que previamente fue ocupada por el folículo ovulatorio. Las células de la teca interna se multiplican y diferencian en células lúteas chicas (10-22  $\mu\text{m}$  de diámetro), las cuales aumentan en número pero no en tamaño. Estas células constituyen aproximadamente el 20 % del volumen del CL y representan el 25 % de las células (Farin *et al.*, 1986; Wiltbank y Niswender, 1992). En contraste, las células de la granulosa se hipertrofian pero no se multiplican, por lo que dan origen a un número de células lúteas grandes ( $> 25 \mu\text{m}$  de diámetro) que coincide con el número de las células de la granulosa presentes originalmente. Las células grandes llegan a representar el 40 % del volumen del CL y el 10 % del total de células (Farin *et al.*, 1986; Wiltbank y Niswender, 1992). Existe controversia acerca de la posibilidad de que las células chicas se diferencien en células grandes durante la fase lútea. Bajo ciertas condiciones experimentales, como lo es el tratamiento con hCG o LH, las células chicas se transforman en células grandes (Farin *et al.*, 1988). Sin embargo, esto no se ha podido demostrar con concentraciones fisiológicas de LH (O'Shea *et al.*, 1986; Farin *et al.*, 1990).

El cuerpo lúteo es uno de los órganos que muestran uno de los mayores índices de crecimiento (Niswender *et al.*, 1994). En el día 3 después de la ovulación las concentraciones de progesterona en sangre comienzan a incrementarse, y en el día 5 ya se detectan concentraciones mayores a 1 ng/ml, lo que indica que el CL ha adquirido su plena funcionalidad. A partir de ese momento y hasta el día 14 del ciclo, el cuerpo lúteo secretará progesterona (Quirke *et al.*, 1979).



### 2.2.2 Control de la función del cuerpo lúteo

La progesterona es el principal producto de secreción del cuerpo lúteo. La progesterona actúa básicamente sobre los órganos genitales de la hembra, siendo responsable de la preparación del útero para el establecimiento y mantenimiento de la gestación (Alila y Dowd, 1991). En la mucosa del oviducto y del útero, la progesterona estimula la secreción de sustancias que nutrirán al embrión hasta que este comience a nutrirse a través de la placenta. Además, la progesterona evita las contracciones del útero, cierra el cérvix y modifica las características del moco cervical, volviéndolo más viscoso, lo que evita el paso de agentes extraños al interior del útero. Por otra parte, la progesterona estimula el desarrollo del sistema alveolar de la glándula mamaria, preparándola para la síntesis y secreción de leche (Niswender y Nett, 1994).

Tanto las células lúteas chicas como las grandes obtienen de la sangre las sustancias precursoras de las hormonas esteroideas, siendo el colesterol el más importante. Aunque el colesterol puede ser sintetizado dentro de la célula lútea a partir de acetato (*síntesis de novo*), cerca del 80% del colesterol utilizado en la síntesis de progesterona es tomado de la sangre (Grummer y Carroll, 1988; Henricks, 1991). El colesterol es transportado en la sangre unido a las lipoproteínas de alta (HDL) y baja densidad (LDL), en la oveja las HDL son consideradas las más importantes en el transporte del colesterol al cuerpo lúteo (Wiltbank, 1994). Las células lúteas grandes y chicas poseen receptores para las lipoproteínas transportadoras de colesterol, los cuales se incrementan conforme aumenta la capacidad esteroideogénica de estas células. Las lipoproteínas se fijan a sus receptores y son internalizadas por un proceso de endocitosis (Grummer y Carroll, 1988). Posteriormente, el colesterol es liberado por acción enzimática; el colesterol libre puede ser utilizado inmediatamente para la síntesis de progesterona, o bien almacenarse en forma libre o esterificado, en cuyo caso se almacena en pequeñas gotas para ser utilizado posteriormente. Las células lúteas grandes almacenan muy poca cantidad de colesterol esterificado en forma de gotas, y dependen más del aporte continuo de colesterol a través de las lipoproteínas (Grummer y Carroll, 1988; Henricks, 1991).

La progesterona es el primer producto biológicamente activo en el proceso de síntesis de las hormonas esteroides. La síntesis de esta hormona comienza cuando el colesterol es transferido del citoplasma a la cara interna de la membrana mitocondrial por medio de una proteína transportadora; en este sitio el colesterol es transformado en pregnenolona mediante la acción de la enzima 20, 22 desmolasa de colesterol. Posteriormente la pregnenolona es transformada en progesterona en el retículo endoplásmico liso por la enzima 3  $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa isomerasa (Henricks, 1991). No obstante que las células lúteas derivan de las células de la teca interna y de la granulosa, en el cuerpo lúteo el proceso de esteroidogénesis termina con la síntesis de progesterona, ya que la progesterona no es utilizada como sustrato para la producción de andrógenos y estrógenos, como ocurre en el folículo (Vos y Fortune, 1993).

La progesterona es secretada después de sintetizada debido a que las células esteroidogénicas carecen de la capacidad de almacenamiento (Hansel *et al.*, 1991). La secreción de progesterona tiene un comportamiento pulsátil con una frecuencia de entre 1.6 a 3.2 pulsos en 8 horas, los cuales no coinciden con los pulsos de LH (Alecozay *et al.*, 1988; McNeilly *et al.*, 1992a). Lo anterior contrasta con lo que ocurre con los pulsos de estradiol durante el ciclo estral, donde se observa que cada pico de estradiol es precedido por un pico de LH (Baird *et al.*, 1991).

El proceso de síntesis de progesterona es similar en los dos tipos celulares del cuerpo lúteo, no obstante los mecanismos de control son diferentes. De esta forma, las células grandes tienen una producción basal de progesterona independiente del estímulo de la LH, y cerca del 80 % de la progesterona es producida por estas células (Wiltbank, 1994), en contraste la producción de progesterona por las células chicas es dependiente de la LH (Hansel *et al.*, 1991).

La LH es la hormona más importante que regula la función del cuerpo lúteo (Baird, 1992). Se ha observado, mediante la hipofisectomía o la utilización de un antagonista de LH, que la falta de ésta hormona ocasiona una disminución de la secreción de progesterona, aunque no

termina con la función del cuerpo lúteo (Farin *et al.*, 1990; Baird, 1992). Por otra parte, la administración de LH alarga la vida del cuerpo lúteo y estimula la secreción de progesterona *in vivo* e *in vitro* (Karsch *et al.*, 1971; Baird, 1992). Además, existe una correlación positiva entre el número de receptores para LH en el cuerpo lúteo y la producción de progesterona (Diekman *et al.*, 1978).

Las células chicas tienen receptores para LH y son dependientes de esta hormona en la producción de progesterona (Harrison *et al.*, 1987). En éstas células la LH estimula la síntesis de proteínas, incluyendo enzimas esteroideogénicas y la proteína ligadora de colesterol. También activa la esterasa de colesterol, regula el transporte del colesterol a través de las paredes de las mitocondrias y regula la internalización del colesterol a partir del medio extracelular. Todos estos efectos son mediados por la activación del AMP-cíclico y la proteína cinasa A (Henricks, 1991).

Las células lúteas grandes también poseen receptores para la LH. Sin embargo, la producción de progesterona en estas células es independiente de la regulación de la LH y del AMP-cíclico (Harrison *et al.*, 1987; Hansel *et al.*, 1991). Por ésta razón, la inhibición de la secreción de LH durante la fase lútea no suprime la secreción de progesterona debido a que cerca del 80 % de la progesterona es producida por las células grandes del cuerpo lúteo (Hansel *et al.*, 1991; McNeilly *et al.*, 1992a).

Durante la fase lútea la secreción de LH se encuentra en su nivel más bajo, observándose una correlación negativa entre las concentraciones de ésta hormona y la progesterona. En este momento los pulsos de LH son poco frecuentes y de gran amplitud en relación a los observados durante la fase folicular del ciclo. Además, el efecto inhibitorio de la progesterona sobre la secreción de LH se potencializa por la presencia de estradiol (Karsch *et al.*, 1987). A pesar de esto, durante este período las concentraciones de progesterona alcanzan sus niveles más altos, lo que indica que la progesterona está siendo regulada por mecanismos independientes de la LH, y que por lo tanto existe una contribución baja de las células lúteas chicas, las cuales son dependientes de la LH (Hansel *et al.*, 1991). Bajo estas circunstancias,

es evidente que la LH no tiene un efecto agudo sobre la secreción de progesterona, posiblemente las concentraciones basales son suficientes para permitir la función del cuerpo lúteo y particularmente la de las células chicas (Wiltbank, 1994).

Los mecanismos de regulación de las células grandes no se conocen todavía. En la vaca se ha demostrado que las células grandes poseen receptores para la hormona de crecimiento, y que ésta hormona incrementa la producción de progesterona (Lucy *et al.*, 1993, 1994). Asimismo, la insulina estimula la secreción de progesterona (Sauerwein *et al.*, 1992). Existe evidencia que la función lútea puede ser regulada no solamente por hormonas hipofisiarias sino también por otras hormonas o factores producidos en el mismo ovario. En el cuerpo lúteo se producen la PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , las dos primeras estimulan la producción de progesterona, mientras que la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  inhibe su secreción (Fitz *et al.*, 1984). También el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1) (Einspanier *et al.*, 1990) y el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) (Stirling *et al.*, 1991), producidos en el cuerpo lúteo, participan en la regulación de la esteroidogénesis.

En el folículo existe interacción entre las células de la granulosa y las células de la teca interna para la producción de estradiol. En contraste, no se ha demostrado en forma concluyente que haya una interacción entre las células grandes y chicas del cuerpo lúteo. Por un lado, algunos investigadores (Harrison *et al.*, 1987; Hansel *et al.*, 1991) han encontrado que existe un sinergismo en la producción de progesterona entre estos dos tipos celulares, mientras otros (Rodgers *et al.*, 1985) no han observado ésta interacción.

Además de progesterona las células grandes del cuerpo lúteo sintetizan oxitocina, mientras que las células chicas carecen de esta función. La síntesis de oxitocina comienza en las células de la granulosa del folículo preovulatorio y se mantiene en las células lúteas grandes. Una vez sintetizada la oxitocina se almacena en gránulos secretorios hasta ser liberados por exocitosis (Sawyer *et al.*, 1986). Después de la ovulación la secreción de oxitocina se incrementa y llega a su nivel máximo en la fase lútea temprana (día 4 del ciclo), se mantiene durante la fase lútea media (día 10) y después decrece gradualmente antes de la luteólisis

(Wathes y Denning-Kendall, 1992). La oxitocina de origen ovárico tiene acciones endócrinas y parácrinas; puede participar en las contracciones del oviducto que favorecen el transporte de los gametos (Luck, 1989). Durante la luteólisis la oxitocina participa en el establecimiento del patrón de secreción pulsátil de la  $PGF2\alpha$  necesario para ocasionar la regresión del cuerpo lúteo (Silvia *et al.*, 1991). Por otra parte, la oxitocina estimula la secreción de progesterona en condiciones *in vitro*, sin embargo, su papel en la regulación de la función del cuerpo lúteo se desconoce (Wathes y Denning-Kendall, 1992).

### 2.3 REGRESION DEL CUERPO LUTEO

La vida del cuerpo lúteo determina la longitud de los ciclos estrales, de tal forma que la variación en la duración de los ciclos que existe entre individuos obedece al momento en que ocurre la regresión del cuerpo lúteo ocasionada por la liberación uterina de la prostaglandina  $F2\alpha$  (McCracken *et al.*, 1981; Zarco *et al.*, 1988a).

Una vez que la hembra comienza su actividad ovárica en la pubertad, época reproductiva o en el posparto los ciclos continúan presentándose regularmente hasta que la hembra quede gestante o hasta el término de la época reproductiva. Esta ventaja evolutiva permite a las hembras tener varias oportunidades para quedar gestantes, pero también las obliga a desarrollar un mecanismo que evite la regresión del cuerpo lúteo para que se establezca la gestación (Zarco *et al.*, 1988b).

El cuerpo lúteo es de los pocos órganos que tienen una fase de crecimiento, desarrollo y regresión. La regresión lútea es ocasionada por la liberación pulsátil de  $PGF2\alpha$ , la cual actúa sobre el CL ocasionando cambios que conducen a su degeneración (Silvia *et al.*, 1991). La  $PGF2\alpha$  actúa directamente en las células grandes, ya que sólo ellas poseen receptores para esta hormona; las células chicas carecen de receptores para la  $PGF2\alpha$ , a pesar de lo cual degeneran como consecuencia de los cambios provocados por la  $PGF2\alpha$  en las células grandes (Wiltbank y Niswender, 1992).

### 2.3.1 Biosíntesis de la Prostaglandina F<sub>2α</sub>

Las prostaglandinas se sintetizan a partir del ácido araquidónico, el cual es un ácido graso esencial polinsaturado (Leaver y Poyser, 1981). El ácido araquidónico forma parte de la fracción de fosfolípidos que se encuentra constituyendo la membrana plasmática de todas las células del organismo; por ésta razón, cualquier célula tienen el potencial para producir prostaglandinas (Granström, 1981).

Un paso limitante en la síntesis de prostaglandinas es la disponibilidad del ácido araquidónico libre. Este ácido graso se encuentra formando parte de los fosfolípidos y el primer paso de la síntesis de prostaglandinas consiste en su liberación, lo que es promovido por la enzima fosfolipasa A (Leaver y Poyser, 1981). La activación de la fosfolipasa A depende de estímulos hormonales, nerviosos, químicos, farmacológicos y mecánicos (Granström, 1981). El siguiente paso consiste en una reacción de oxigenación donde participa la enzima ciclooxigenasa, o sintetasa de prostaglandinas, la cual cataliza la conversión del ácido araquidónico en los endoperóxidos PGG<sub>2</sub> (prostaglandina G<sub>2</sub>) y PGH<sub>2</sub> (prostaglandina H<sub>2</sub>); estos compuestos intermedios poseen una actividad biológica importante, ya que ocasionan agregación plaquetaria, vasoconstricción y vasodilatación en el músculo liso del aparato respiratorio. Los endoperoxidos pueden ser convertidos en las prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), PGD<sub>2</sub>, lo cual depende del complemento enzimático de cada tejido, y de las condiciones en las cuales se producen. Cada uno de estos tipos de prostaglandinas tiene diferentes funciones biológicas; algunas participan en eventos reproductivos, mientras otras están involucradas en situaciones patológicas, siendo mediadoras de la fiebre, dolor e inflamación (Granström, 1981).

La PGE<sub>2</sub> y la PGF<sub>2α</sub> son las prostaglandinas más importantes desde el punto de vista reproductivo. La PGE<sub>2</sub> participa en la regulación de las contracciones del útero y oviducto (Bygdeman, 1981; Silvia *et al.*, 1984). La PGF<sub>2α</sub> interviene en la ovulación y en la regulación de las contracciones del útero, pero su principal función consiste en provocar la regresión del cuerpo lúteo (Bygdeman, 1981).

Después de cumplir con su función biológica la  $\text{PGF2}\alpha$  es rápidamente metabolizada en los pulmones y es transformada en los metabolitos 15-ceto-13,14 dihidro  $\text{PGF2}\alpha$  y 11 cetotetranor  $\text{PGF2}\alpha$ , los cuales pueden ser medidos en sangre y orina por radioinmunoanálisis (Kindahl, 1981).

### 2.3.2 Control de la secreción de la $\text{PGF2}\alpha$

El mecanismo por el cual se inicia la síntesis y secreción de la  $\text{PGF2}\alpha$  depende de una interacción entre el cuerpo lúteo, los folículos ováricos y el útero (McCracken *et al.*, 1984).

Los estrógenos ováricos desempeñan un papel importante en el inicio de la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  (Silvia *et al.*, 1991). La administración de estradiol exógeno en el diestro tardío puede provocar la luteólisis (Hixon y Flint, 1987). Sin embargo, ésta hormona no actúa directamente sobre el cuerpo lúteo, sino que lo hace indirectamente a través de su papel permisivo para que la oxitocina estimule en el endometrio la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$ . Esto se debe a que el estradiol estimula la síntesis de receptores para oxitocina (Sheldrick y Flint, 1985; Beard y Lamming, 1994). Por otra parte, el estradiol estimula en el endometrio la producción de enzimas como la fosfolipasa A y la ciclooxigenasa, que son indispensables para la síntesis de  $\text{PGF2}\alpha$  (Hixon y Flint, 1987; Silvia *et al.*, 1991).

Es posible retrasar la luteólisis eliminando la fuente de estradiol en ovejas (Ginther, 1971) y en vacas (Villa-Godoy *et al.*, 1985), lo cual se logra mediante la destrucción de los folículos ováricos durante la fase lútea tardía. Además, el tratamiento con un antagonista de estrógenos suprime la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  en vaquillas (Jacobs *et al.*, 1988).

Durante un ciclo normal, después de un periodo de 10 días de exposición a progesterona el estradiol desencadena el mecanismo de secreción de la  $\text{PGF2}\alpha$  (Beard y Lamming, 1994). La progesterona ejerce un efecto inhibitorio sobre la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$ , este efecto es debido a que la progesterona inhibe la formación de receptores para estradiol en el endometrio, y por lo tanto el estradiol no puede estimular la síntesis de receptores a oxitocina (McCracken *et al.*, 1984). Este efecto de la progesterona depende del tiempo de exposición y de las

concentraciones de esta hormona, siendo más efectivo a concentraciones más altas (Beard y Lamming, 1994; Lamming y Mann, 1995). Eventualmente el útero se vuelve refractario al estímulo de la progesterona, esto ocurre normalmente después de 10 días de exposición a ésta hormona, ya que este tiempo es suficiente para que se agoten sus propios receptores (down regulation) (Vallet *et al.*, 1990). Cuando esto ocurre, la progesterona ya no es capaz de inhibir la síntesis de receptores para estradiol, entonces el estradiol producido por los folículos ováricos estimulará la formación de receptores para oxitocina. Así, la oxitocina producida por el cuerpo lúteo estimulará la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  (Beard y Lamming, 1994).

Por otra parte, se ha observado que durante el período en que el útero es expuesto a progesterona se acumulan gotas de lípidos en las células del epitelio, lo que aumenta la disponibilidad de precursores para la síntesis de la  $\text{PGF2}\alpha$  (Brinsfield y Hawk, 1973). Asimismo, se ha visto que la progesterona provoca un incremento en las concentraciones de la enzima ciclooxigenasa (Raw *et al.*, 1988). Lo anterior indica que existen cambios dependientes de progesterona que están relacionados directamente con la capacidad del endometrio para secretar  $\text{PGF2}\alpha$ .

La oxitocina es una de las tres principales hormonas implicadas en el control de la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$ . La administración de oxitocina en el día 14 del ciclo ocasiona una liberación de  $\text{PGF2}\alpha$  (Fairclough *et al.*, 1984), mientras que la inmunización contra oxitocina retrasa la luteólisis (Sheldrick *et al.*, 1980). La secreción de la  $\text{PGF2}\alpha$  depende de la unión de la oxitocina a sus receptores en el endometrio. A partir del día 13 del ciclo estral aumenta el número de receptores de oxitocina en el endometrio, y este evento determina el momento en que inicia la luteólisis, (Silvia *et al.*, 1991). Por otra parte, si los receptores aparecen demasiado temprano la regresión del cuerpo lúteo se adelanta, como ocurre en las ovejas que desarrollan cuerpo lúteos de vida corta en la primera ovulación de la época reproductiva, del posparto y en la pubertad (Hunter, 1991).

El incremento del número de receptores de oxitocina es una condición que determina la secuencia de eventos que conducen a la secreción de prostaglandina  $\text{F2}\alpha$ , y el incremento en



el número de estos depende de la interacción del estradiol con la progesterona y también obedece a la presencia o no de una gestación (Silvia *et al.*, 1984).

### 2.3.3 Establecimiento de la secreción pulsátil de PGF2 $\alpha$

Para que la PGF2 $\alpha$  ocasione la regresión del cuerpo lúteo debe secretarse en un patrón pulsátil, donde los pulsos deben ocurrir a intervalos de 6 a 8 horas, si esta secreción pulsátil frecuente no se llega a establecer el cuerpo lúteo no se destruye (Zarco *et al.*, 1984; Zarco *et al.*, 1988a).

Zarco *et al.*, (1988a) encontraron que durante la luteólisis de la oveja se presentaron en promedio 8 pulsos de PGF2 $\alpha$ ; 2 de estos pulsos ocurrieron antes de la luteólisis funcional, con un intervalo entre pulsos de 16 horas, mientras que 6 pulsos estuvieron asociados con la luteólisis, y se presentaron a intervalos de 8 horas. El número de pulsos y la frecuencia con que se presentan es determinante para ocasionar la regresión lútea, Schramm *et al.*, (1983) encontraron que la administración de 4 pulsos de PGF2 $\alpha$  en dosis bajas no fué suficiente para ocasionar luteólisis, mientras que 5 pulsos con las mismas características si destruyeron el cuerpo lúteo. Por otra parte, Zarco *et al.* (1984) observaron que las ovejas que presentaron persistencia espontánea de cuerpo lúteo tuvieron un patrón de secreción pulsátil de PGF2 $\alpha$  con intervalos de 18 horas. De la misma forma, cuando la secreción de PGF2 $\alpha$  cambia de un patrón pulsátil a uno continuo no se produce la regresión lútea, condición que se ha observado durante el reconocimiento materno de la gestación en la oveja (Zarco *et al.*, 1988b).

Un pulso de PGF2 $\alpha$  consiste en una etapa activa de síntesis y liberación, seguida después de algunas horas por otra etapa donde cesa la liberación abruptamente (Kindahl, 1994). El establecimiento del patrón pulsátil de secreción de PGF2 $\alpha$  depende básicamente de la interacción entre la PGF2 $\alpha$  y la oxitocina proveniente del cuerpo lúteo. Existe un comportamiento sincrónico entre los pulsos de PGF2 $\alpha$  y los pulsos de oxitocina, y es evidente el establecimiento de una retroalimentación positiva entre éstas dos hormonas (Flint *et al.*, 1990).

Al inicio de la secreción pulsátil de  $\text{PGF2}\alpha$  se observa primero un pulso de  $\text{PGF2}\alpha$  sin que le preceda un pulso de oxitocina; el mecanismo por el cual se produce el primer pulso de  $\text{PGF2}\alpha$  se desconoce, sin embargo se ha asociado con la secreción de oxitocina de origen neurohipofisiario (McCracken *et al.*, 1991).

McCracken *et al.* (1984), propusieron un modelo que explica el mecanismo por el cual se establece la secreción pulsátil de  $\text{PGF2}\alpha$ : La neurohipófisis libera oxitocina en forma pulsátil, y uno de estos pulsos estimula la liberación de  $\text{PGF2}\alpha$ . Este primer pulso de  $\text{PGF2}\alpha$ , el cual es de baja magnitud, estimula la liberación de oxitocina de origen lúteo. Así, se establece un mecanismo de retroalimentación positivo entre éstas dos hormonas. La oxitocina puede tener dos efectos; en primer lugar puede estimular una mayor liberación de  $\text{PGF2}\alpha$  y en segundo lugar la alta concentración de oxitocina provoca la pérdida de la sensibilidad del endometrio. El intervalo entre pulsos de  $\text{PGF2}\alpha$  está determinado por la pérdida de la sensibilidad del endometrio a la oxitocina y por el tiempo que tarda en recuperarla. El mecanismo de retroalimentación positiva se interrumpe y se vuelve a establecer hasta que pasan 6 horas, tiempo suficiente para que el endometrio recupere la sensibilidad a la oxitocina; por este motivo los pulsos de  $\text{PGF2}\alpha$  se presentan con un intervalo de 6 a 8 horas. En éste mecanismo el papel del estradiol es importante, ya que promueve la síntesis de receptores a oxitocina. Este concepto es apoyado por los resultados obtenidos por Zhang *et al.* (1991) quienes encontraron que la supresión de estradiol mediante la destrucción de los folículos ováricos en el diestro tardío alargó el intervalo entre los pulsos de  $\text{PGF2}\alpha$  y evitó la regresión del cuerpo lúteo. La secreción pulsátil de  $\text{PGF2}\alpha$  continúa hasta que se completa la regresión del cuerpo lúteo.

#### 2.3.4 Mecanismo de acción de la $\text{PGF2}\alpha$

Después de llegar al ovario por un mecanismo local, sin pasar por la circulación general (Ginther, 1981), la  $\text{PGF2}\alpha$  ejerce su función luteolítica a través de la unión con sus receptores en el cuerpo lúteo (Pate, 1994). Las células grandes poseen receptores para la  $\text{PGF2}\alpha$ , mientras que las células chicas carecen de ellos (Fitz *et al.*, 1982).

Existen diversas teorías acerca del mecanismo de acción de la  $\text{PGF2}\alpha$ . Por un lado, se ha propuesto que la  $\text{PGF2}\alpha$  ocasiona una disminución del flujo sanguíneo hacia el cuerpo lúteo; sin embargo esta teoría carece de consistencia, ya que si bien se observa una reducción del flujo sanguíneo durante la luteólisis, éste flujo continua siendo hasta 20 veces mayor en el cuerpo lúteo que en el resto del tejido ovárico. Además, es difícil demostrar si esa reducción de la circulación sanguínea es causa o efecto de la regresión lútea (Wiltbank y Niswender, 1992). Por otra parte, se propone que la  $\text{PGF2}\alpha$  actúa directamente sobre las células lúteas, modificando su capacidad para la síntesis de progesterona mediante la reducción del número de receptores para LH y afectando la utilización del colesterol (Alila y Dowd, 1991).

La  $\text{PGF2}\alpha$  ocasiona degeneración y muerte de las células del cuerpo lúteo. El primer blanco de la  $\text{PGF2}\alpha$  son las células grandes. Wiltbank y Niswender (1992) propusieron un modelo del mecanismo de acción de la  $\text{PGF2}\alpha$  sobre las células grandes: La  $\text{PGF2}\alpha$  se fija a sus receptores en las células grandes, donde activa a la fosfolipasa C, la cual promueve un incremento del calcio intracelular. Debido a esto se activa la proteína cinasa C. Esta última proteína inhibe la producción de progesterona. Posteriormente, debido al incremento de la proteína cinasa C y del calcio intracelular se provoca la degeneración y muerte celular. Las células chicas no poseen receptores para la  $\text{PGF2}\alpha$ , por lo tanto no degeneran por un efecto directo de la  $\text{PGF2}\alpha$ , sino que mueren como consecuencia de la producción de sustancias citotóxicas durante la degeneración de las células grandes (Pate, 1994).

#### 2.4 REGRESION PREMATURA DEL CUERPO LUTEO

En la oveja existen varias condiciones fisiológicas en las cuales se producen ciclos estrales de corta duración debido a la regresión prematura del cuerpo lúteo. De ésta forma, se desarrollan cuerpos lúteos de vida corta en la primera ovulación que se presenta al llegar a la pubertad (Rodríguez, 1991), al iniciarse la estación reproductiva (Oldham y Martin, 1979), en la primera ovulación posparto (Sharpe *et al.* 1986; Braden *et al.* 1989a,b), así como en las ovulaciones inducidas durante la época de anestro con la hormona liberadora de

gonadotropinas, o con la gonadotropina coriónica humana (McLeod *et al.*, 1982a, 1982b; Balcázar, 1995).

Los cuerpos lúteos de vida corta se caracterizan por generar elevaciones transitorias de progesterona que rara vez llegan a ser mayores de 1 ng/ml, y porque la regresión lútea ocurre entre el día 4 a 5 después de la ovulación (Beard y Hunter, 1994; Balcázar, 1995). La importancia de esta pequeña fase lútea dentro del control neuroendócrino del ciclo estral se desconoce, sin embargo Legan *et al.* (1985) mencionan que esta elevación transitoria de progesterona es importante para el establecimiento de la sincronización que se debe dar entre el desarrollo folicular y el pico preovulatorio de LH.

El estudio de la etiología de los cuerpos lúteos de vida corta se ha dirigido hacia dos líneas bien definidas, la primera señala que estos cuerpos lúteos son consecuencia de la ovulación de un folículo inmaduro que se desarrolló en un ambiente hormonal inadecuado, y la segunda menciona que los cuerpos lúteos de vida corta son intrínsecamente normales y que su regresión prematura obedece a una liberación anticipada de la prostaglandina F2 $\alpha$ .

#### 2.4.1 Desarrollo folicular inadecuado

Garverick *et al.*, (1992) mencionan que la fase lútea es una continuación de la maduración folicular, por tal motivo las características funcionales del cuerpo lúteo serán consecuencia de las condiciones en que se desarrolló el folículo ovulatorio. Partiendo de este concepto es posible que las fases lúteas de corta duración sean consecuencia de la ovulación de un folículo anormal o inmaduro.

En las ovejas anéstricas existe una dinámica folicular similar a la de las ovejas que están ciclando (Souza *et al.*, 1995). Durante ésta etapa el desarrollo folicular es estimulado por la secreción de FSH, sin embargo, ninguno de los folículos llega a ovular debido a la carencia de un estímulo apropiado de la LH (McNatty *et al.*, 1984). En ovejas existe evidencia que indica que los folículos que dieron origen a cuerpos lúteos de vida corta presentan menor capacidad esteroidogénica y menor número de receptores para LH que los folículos que dieron origen a

cuerpos lúteos normales (Hunter *et al.*, 1986; White *et al.*, 1987). Asimismo, en vacas también se ha observado que los folículos que dan origen a cuerpos lúteos de vida corta producen menos estradiol y tienen una menor concentración de receptores de LH (Braden *et al.*, 1989b; Inskeep *et al.*, 1988).

Ramírez-Godinez *et al.* (1982) encontraron que las vacas que desarrollaron cuerpos lúteos de vida corta presentaron menores concentraciones de FSH 4 días antes de la ovulación. Asimismo, García-Winder *et al.*, (1986) e Inskeep *et al.*, (1988) observaron en vacas en anestro posparto tratadas con norgestomet, que tuvieron un incremento de la secreción preovulatoria de LH y desarrollaron cuerpos lúteos de vida normal comparativamente con las vacas no tratadas con progestágenos. Estos investigadores proponen que esta diferencia en la secreción de LH y FSH es la responsable de la formación de cuerpos lúteos de vida corta en vacas. Sin embargo, Garverick *et al.*, (1988) en un trabajo similar no encontraron diferencias en la secreción de gonadotropinas en vacas que desarrollaron cuerpos lúteos de vida corta y vida normal.

La inducción de la ovulación en ovejas anéstricas con una sola administración de GnRH o hCG provoca el desarrollo de cuerpos lúteos de vida corta (Hunter, 1991), sin embargo cuando el tratamiento con GnRH se aplicó a ovejas con un esquema similar al que ocurre bajo condiciones fisiológicas durante la etapa de transición entre la fase lútea y la folicular de un ciclo normal, es decir administrando un pulso cada 3 h por 24 h, seguido de 1 pulso cada 2 h por 24 h y finalmente un pulso cada hora por 24 h; el 100% de los animales tuvieron fases lúteas normales (Baird, 1992). Por otra parte, el pretratamiento con norgestomet en ovejas que se inducen a ovular con GnRH ocasiona que los cuerpos lúteos que se formen sean de vida normal; este efecto se ha asociado con la capacidad esteroidogénica del folículo preovulatorio ya que los folículos que se desarrollan bajo ese ambiente hormonal tienen mayor producción de estradiol (Hunter, 1991). Los trabajos anteriores indican que el ambiente hormonal antes de que ocurra la ovulación tiene una asociación con la regresión prematura del cuerpo lúteo.

Como ya se señaló en el párrafo anterior la LH posiblemente está relacionada con el desarrollo de cuerpos lúteos de corta duración pero éste efecto probablemente lo ejercen durante el crecimiento folicular y no durante el desarrollo del cuerpo lúteo. Garverick *et al.*, (1988) observaron que la frecuencia, amplitud y duración de los pulsos de LH fue similar en las vacas que presentaron cuerpos luteos de vida corta que en las que tuvieron cuerpos lúteos de vida normal. Asimismo, Braden *et al.*, (1989a) en ovejas no encontraron diferencias en el número de receptores de la LH en los cuerpos lúteos de vida corta y los cuerpos lúteos normales, lo que indica que la regresión prematura no ocurre por una falta de estímulo luteotrópico.

#### 2.4.3 Liberación prematura de PGF2 $\alpha$

Braden *et al.* (1989a) observaron en la oveja que los cuerpos lúteos de corta duración tienen las mismas características morfofisiológicas que los cuerpos lúteos de un ciclo normal; de tal forma que el número de receptores para LH y para PGF2 $\alpha$ , así como la proporción y capacidad esteroidogénica de las células grandes y chicas es similar.

Existe información en ovejas (Hunter *et al.*, 1989) y en vacas (Peter *et al.*, 1989) donde es evidente que la regresión prematura del cuerpo lúteo obedece a una liberación anticipada de PGF2 $\alpha$ , presentándose la luteólisis en forma similar a la que ocurre al final de una fase lútea normal.

El empleo de inhibidores de la síntesis de PGF2 $\alpha$  en vacas posparto (Troxel y Kesler, 1984), así como la histerectomía en ovejas prepúberes o anéstricas inducidas a ovular y a desarrollar un cuerpo lúteo de corta duración, prolongan la fase lútea (Keisler *et al.*, 1983; Southee *et al.*, 1988).

El útero de los animales con fases lúteas cortas secreta prematuramente PGF2 $\alpha$ ; la causa de esta liberación no se conoce totalmente, sin embargo se ha observado que las ovejas que presentan cuerpos lúteos de vida corta tienen en el endometrio una alta concentración de receptores a oxitocina en el día 5 después de la ovulación, y durante la luteólisis es evidente

una asociación entre los picos máximos de oxitocina y la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$ , tal y como ocurre en una luteólisis de un ciclo normal (Hunter *et al.*, 1989; Silvia *et al.*, 1991). Asimismo, Zollers *et al.*, (1989) demostraron que las vacas posparto con cuerpos lúteos de vida corta liberaron  $\text{PGF2}\alpha$  cuando fueron estimuladas mediante la administración de oxitocina en el día 5, lo que confirma la aparición temprana de receptores para oxitocina en este tipo animales.

En ovejas inducidas a ovular durante el anestro y que son tratadas previamente con progestágenos, el cuerpo lúteo que se desarrolla es de vida normal (McLeod y Haresign, 1984; Hunter, 1991). Por otra parte, cuando en ovejas ciclando se suspende la ciclicidad mediante la administración crónica de un agonista de GnRH, el reinicio de la actividad ovárica se caracteriza por la formación de cuerpos lúteos de vida corta (Legan *et al.*, 1991). Es evidente entonces que el útero que no ha sido expuesto previamente a progesterona secreta prematuramente  $\text{PGF2}\alpha$  en la primera fase lútea; a este respecto Hunter, (1991) menciona que las ovejas anéstricas inducidas a ovular y que son pretratadas con progestágenos no desarrollan receptores a la oxitocina en el día 3, lo que evita la luteólisis prematura.

La progesterona desempeña un papel importante en la programación del inicio de la liberación pulsátil de  $\text{PGF2}\alpha$ . En el endometrio inhibe la formación de receptores para estradiol y solo después de 10 días de exposición los receptores de progesterona desaparecen, lo que permite la síntesis de receptores para estradiol. Posteriormente el estradiol estimulará en el endometrio la formación de receptores para oxitocina, y así la oxitocina producida por el cuerpo lúteo iniciará la secreción pulsátil de  $\text{PGF2}\alpha$  (Silvia *et al.*, 1991).

Garverick *et al.*, (1992) mencionan que la influencia de la progesterona previa a la ovulación inducida, es a través de un incremento de la producción de estradiol de los folículos preovulatorios. Este aumento en las concentraciones de estradiol estimula en el endometrio la síntesis de receptores a progesterona. Así, la progesterona del cuerpo lúteo inhibirá el desarrollo prematuro de receptores para estradiol y por consiguiente de la oxitocina, y de esta forma la liberación de prostaglandina ocurrirá como en cualquier ciclo normal. En caso contrario, cuando no hay influencia de progesterona, como ocurre en condiciones naturales, el

folículo preovulatorio produce poco estradiol y no se forman suficientes receptores a progesterona, lo cual permite que aparezcan prematuramente receptores de estradiol y luego de oxitocina, ocasionando que se libere la  $\text{PGF2}\alpha$ .

Existe evidencia que apoya lo propuesto por Garverick *et al.*, (1992). Recientemente Beard y Hunter, (1994) utilizando líquido folicular bovino, y Balcázar, (1995) utilizando líquido folicular equino, lograron suprimir la producción de estradiol en ovejas anéstricas inducidas a ovular, y de ésta forma evitaron la regresión prematura de los cuerpos lúteos. Asimismo, Beard y Hunter (1994) observaron que las ovejas tratadas con líquido folicular y que recibieron estradiol exógeno tuvieron luteólisis prematura, mientras que en las que solo recibieron líquido folicular una alta proporción de ellas tuvieron fases lúteas normales. Lo anterior apoya el concepto de que en las ovejas con luteólisis prematura aparecen tempranamente receptores a estradiol y esta hormona estimula la síntesis de receptores para la oxitocina, lo que permite el inicio de la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$ .

Por otra parte, existe información que indica que la producción de estradiol durante los 6 días posteriores a la ovulación en ovejas y cabras superovuladas está relacionada con la regresión prematura de los cuerpos lúteos (Battye *et al.*, 1988; Rosas *et al.*, 1995). Saharrea *et al.*, (1995) trabajando con cabras superovuladas con gonadotropina coriónica equina, administraron hCH o GnRH 84 h después del estro, logrando eliminar los folículos estrogénicos, y de ésta forma evitaron la regresión lútea prematura en una elevada proporción de los animales superovulados.

#### 2.4.4 Cuerpos lúteos de vida corta y fertilidad

La regresión prematura del cuerpo lúteo limita la posibilidad de utilizar ese ciclo con fines reproductivos. En los animales destinados a tener una fase lútea corta la fertilización no se afecta, sin embargo la gestación no se establece. Breuel *et al.*, (1993) trabajando con vacas posparto, colectaron los embriones en el día 6 después de la ovulación y observaron que los animales con fases lúteas cortas tuvieron un porcentaje de fertilización (68%) y de



recuperación del óvulo/embrión (79%) similar al de las vacas que desarrollaron fases lúteas normales, lo que indica que la fertilización ocurre normalmente. Sin embargo, la gestación no puede establecerse debido a que cuando ocurre la luteólisis el embrión todavía no es capaz de proporcionar el mensaje para el reconocimiento materno de la gestación, lo que normalmente ocurre en el día 13 en la oveja y en el día 16 en la vaca. Dicho mensaje consiste en la producción embrionaria de la proteína trofoblástica (oTP-1) (Bazer *et al.*, 1991), cuya presencia provoca que la secreción de PGF2 $\alpha$  cambie de un patrón pulsátil, necesario para ocasionar la lisis del cuerpo lúteo, a un patrón continuo de secreción, el cual no ocasiona luteólisis (Zarco *et al.*, 1988b).

Evitar la regresión prematura en ovejas en las cuales se sabe que presentarán fases lúteas cortas (posparto, pubertad, primera ovulación de la época reproductiva y ovulación inducida en ovejas anéstricas y prepúberes) ofrecería la posibilidad de utilizar este ciclo para gestar a esos animales. Por otra parte, la manipulación de la longitud de la fase lútea no solo tendría utilidad en los animales con cuerpos lúteos de vida corta sino también en aquellos a los cuales se les transfiere un embrión retrasado en su desarrollo (Mejía 1995). Además, se verían favorecidas las hembras en las que bajo ciertas circunstancias, como lo es el estrés calórico en la vaca, los embriones se retrasan en su crecimiento y no les da tiempo de establecer oportunamente el reconocimiento materno de la gestación (Putney *et al.*, 1988).

Es posible alargar la vida del cuerpo lúteo mediante la administración de inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, tales como indometacina y el flunixin-meglumine (Troxel y Kesler, 1984; Aiumlamai *et al.*, 1990); sin embargo, estas drogas pueden interferir con el establecimiento de la gestación debido a que inhiben la síntesis de prostaglandinas inespecíficamente (Aiumlamai *et al.*, 1990), y las prostaglandinas son indispensables para la implantación (Gandolfi *et al.*, 1992).

Otra forma de evitar la regresión prematura del cuerpo lúteo podría ser la administración de la proteína trofoblástica ovina que evita la luteólisis durante el reconocimiento de la gestación; esta proteína pertenece a la misma familia del interferón- $\alpha$ , de tal forma que cuando este se ha

administrado exógenamente durante el diestro tardío se prolonga la vida del cuerpo lúteo (Parkinson *et al.*, 1992). La oTP-1 (o el interferón- $\alpha$ ) no se ha utilizado para inhibir la regresión prematura del cuerpo lúteo, sin embargo es posible que sea efectivo ya que su mecanismo de acción es sobre la síntesis de la PGF $2\alpha$ . Sin embargo, se deben administrar antes de que aparezcan los receptores para oxitocina, ya que una vez que están presentes la oTP-1 es incapaz de inhibir la secreción de PGF $2\alpha$  (Bazer *et al.*, 1991). Por otra parte, es probable que la administración del interferón- $\alpha$  no tenga ningún efecto sobre el mejoramiento de la fertilidad, ya que su administración provoca un incremento de la temperatura corporal que pone en riesgo la viabilidad del embrión (Newton *et al.*, 1990).

Una tercera posibilidad para alargar la vida del cuerpo lúteo es la eliminación de la fuente de estradiol en los días en que esta hormona es necesaria para el establecimiento de la secreción pulsátil de PGF $2\alpha$ . Así, Villa-Godoy *et al.* (1985) trabajando con vacas, y Ginther (1971) y Karsch *et al.* (1970) en ovejas, cauterizaron los folículos ováricos en el diestro tardío, logrando alargar la fase lútea.

Existen formas no invasivas para eliminar los folículos estrogénicos, una de ellas es la utilización de GnRH o hCG, con lo cual se ocasiona luteinización y ovulación de los folículos (Beck *et al.*, 1995; Saharrea *et al.*, 1995). Cuando el tratamiento se aplica en el diestro tardío de la vaca se ha observado que se retrasa la luteólisis (Macmillan y Thatcher, 1991). No obstante, esta alternativa no se ha utilizado para evitar la regresión prematura del cuerpo lúteo de la oveja.

Otra posibilidad consiste en la supresión del desarrollo folicular mediante la administración de una fuente rica en inhibina; el líquido folicular bovino es rico en inhibina, por lo que la administración de este fluido, previamente tratado para remover hormonas esteroideas, resulta en una supresión de la secreción de FSH y del desarrollo folicular (Miller *et al.* 1979b; McNeilly, 1984). Beard y Hunter, (1994) utilizando líquido folicular bovino libre de esteroideas lograron suprimir la producción de estradiol en ovejas anéstricas inducidas a ovular y de ésta forma, evitaron la regresión prematura de los cuerpos lúteos. Asimismo, Balcázar (1995), trabajando

con ovejas con cuerpos lúteos de vida corta utilizó líquido folicular equino, previamente tratado para remover la fracción de esteroides, y logró retrasar la luteólisis hasta en un 76% de los animales, lo que posteriormente fue confirmado por Zárate (1996). Estos estudios demostraron la factibilidad de inhibir la regresión prematura del cuerpo lúteo y de utilizar este ciclo con propósitos reproductivos.

### CAPITULO III

#### EFECTO DEL LIQUIDO FOLICULAR EQUINO LIBRE DE ESTEROIDES SOBRE LA SECRECION DE FSH EN OVEJAS EN ANESTRO ESTACIONAL Y LA PRESENTACION DEL ESTRO INDUCIDO CON PGF<sub>2</sub> $\alpha$ EN OVEJAS CICLANDO

##### Resumen

Con el propósito de conocer si la administración de líquido folicular equino libre de esteroides (LFE) suprime la secreción de FSH en ovejas en anestro estacional y retrasa la presentación del estro inducido con prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  se realizaron dos experimentos. En el primer experimento se utilizaron 19 ovejas en anestro estacional divididas en dos grupos. El grupo tratado (n=10) recibió por vía intravenosa 3 ml de LFE cada 8 h durante 5 días. El grupo testigo (n=9) recibió solución salina fisiológica (SSF) en lugar de LFE. El LFE fue tratado previamente con carbón-dextrán para remover la fracción de hormonas esteroides. En ambos grupos se obtuvieron muestras de sangre cada 4 h durante el periodo de aplicación del LFE para la determinación de FSH mediante radioinmunoanálisis en fase líquida. Se compararon las concentraciones de FSH mediante un análisis de varianza, utilizando como variables independientes el tratamiento y la hora en que se tomó la muestra, con el efecto del animal anidado dentro del tratamiento. Las concentraciones de FSH fueron significativamente menores ( $P < 0.05$ ) en las ovejas tratadas con LFE. En el segundo experimento se utilizaron 22 ovejas adultas ciclando. A todas las ovejas se les insertó una esponja intravaginal impregnada con 45 mg de Acetato de Fluorogestona (Chronogest, Intervet, México) para la sincronización del estro. En el día 11 del ciclo subsecuente al estro sincronizado (día 0= día del estro) todas las ovejas fueron tratadas con 15 mg de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (Lutalyse, UpJohn, México) para provocar la regresión del cuerpo lúteo. Las ovejas así tratadas se dividieron en 2 grupos. El grupo tratado (n=11) recibió por vía intravenosa 3 ml de LFE cada 8 horas por 72 horas a partir de la aplicación de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$ . El grupo testigo (n=11) recibió SSF en lugar de LFE. Se detectaron estros 3 veces al día utilizando un macho con mandil, y se consideró el inicio del estro cuando

la hembra aceptó la monta por primera vez. El intervalo de la administración de PGF2 $\alpha$  a la presentación del estro fue significativamente mayor en las ovejas que recibieron LFE (131  $\pm$ 9.9 h) que en las del grupo testigo (44  $\pm$ 3.9 h). Se concluye que el tratamiento con LFE suprime las concentraciones de FSH en ovejas en anestro estacional y retrasa la presentación del estro sincronizado con PGF2 $\alpha$  en ovejas cíclicas, lo que indica que el LFE es una fuente rica en inhibina que tiene actividad biológica en ovejas.

### **Introducción**

La inhibina es una hormona glicoproteica que es producida por las células de la granulosa y está presente en el líquido folicular de la vaca (Knight *et al.*, 1987), oveja (Leversha *et al.*, 1987), cerda (Taya *et al.*, 1991) y yegua (Roser *et al.*, 1994). La administración de inhibina purificada a ovejas ovariectomizadas suprime la secreción de FSH a nivel hipofisiario sin modificar la secreción de LH (Findlay *et al.*, 1987). La inhibina tiene una elevada homología entre especies (Knight, 1991), de tal forma que la supresión de la FSH en la oveja también se ha demostrado administrando líquido folicular bovino (LFB) previamente tratado para remover la fracción de hormonas esteroideas (Knight y Castillo, 1988; McNeilly 1984; Larson *et al.*, 1991; McLeod y McNeilly, 1987). En estos animales se ha observado que después de la administración de LFB se presenta una supresión del desarrollo folicular y de la producción de estradiol, y cuando se administra durante el proestro se retrasa la presentación del estro (Miller *et al.*, 1979b; McNeilly, 1984; McNeilly, 1985; Hunter *et al.*, 1988b).

La utilización de LFB con la finalidad de suprimir el desarrollo folicular, y de esta forma manipular la vida del cuerpo lúteo ofrece buenas posibilidades. A este respecto, Beard y Hunter (1994) administraron LFB a ovejas con cuerpos lúteos de vida corta y lograron inhibir la luteólisis prematura. Asimismo, Miquelajauregui (1993), administró LFB durante los días 10 a 16 del ciclo logrando retrasar la regresión del cuerpo lúteo y alargar el ciclo estral, con lo que se abrió la posibilidad de desarrollar un método para el control de la longitud de la vida del cuerpo lúteo. Sin embargo, no existe mucha disponibilidad de líquido folicular bovino, ya que el

folículo de la vaca es relativamente pequeño (15 a 20 mm como máximo), por lo que se necesita una buena cantidad de folículos para poder contar con suficiente líquido, además de que la mayoría de las vacas que llegan al rastro presentan poco desarrollo folicular.

El líquido folicular equino también representa una fuente rica en inhibina (Roser *et al.*, 1994), además los folículos ováricos de las yeguas son grandes (hasta 50 mm) y casi todas las yeguas presentan desarrollo folicular, aún durante el diestro y la gestación (Ginther, 1990). En la yegua la administración de líquido folicular equino libre de hormonas esteroides (LFE) suprime la secreción de FSH, inhibe el desarrollo folicular y retrasa la presentación del estro (Miller *et al.*, 1979a; Bergfelt y Ginther, 1985; Gremmes, 1990). Sin embargo, no se ha evaluado si el LFE puede provocar estos efectos en la oveja. Por tal razón el objetivo del presente trabajo fue conocer el efecto de la administración de LFE sobre la secreción de FSH de ovejas en anestro estacional y determinar el intervalo a la presentación del estro inducido con PGF2 $\alpha$  en ovejas cíclicas tratadas con LFE.

### **Material y Métodos**

El trabajo se realizó en el Centro de Enseñanza Práctica, Investigación y Extensión en Rumiantes (CEPIER) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizado en el km 29 de la carretera federal México-Cuernavaca. El clima de la región es tipo c(w) (w)b (ij), que corresponde a semifrío-semihúmedo, con lluvias en verano y precipitación pluvial de 800 a 1200 mm (García, 1980).

#### **Preparación del líquido folicular equino**

El LFE fue colectado de yeguas sacrificadas en un rastro local. Inmediatamente después del sacrificio se succionó el líquido de los folículos visibles y se conservó en refrigeración hasta su traslado al laboratorio. El LFE se centrifugó a 1500 g durante 15 minutos a 4 °C para la separación de detritos. Con el fin de remover las hormonas esteroides, se le adicionaron 10 mg/ml de carbón activado y 0.1 mg/ml de dextrán, permaneciendo en agitación magnética

durante 1 hora. Posteriormente, el líquido se centrifugó a 1500 g durante 30 minutos a 4 °C para la separación de las partículas de carbón y dextrán. Este procedimiento se repitió 4 veces, y finalmente el sobrenadante se filtró a través de papel filtro del número 1. Al líquido obtenido de esta forma se le adicionaron 100 UI/ml de penicilina G y se conservó en congelación a -20 °C hasta su utilización (McNeilly, 1984).

La concentración de estradiol y progesterona en el líquido folicular equino antes del tratamiento con carbón-dextrán fue de 760 ng/ml y 124 ng/ml, y después del tratamiento fue de 0.4 ng/ml y 0.02 ng/ml respectivamente, encontrándose que la técnica utilizada permitió remover más del 99 % de ambas hormonas esteroideas.

#### Experimento 1

El trabajo se realizó en los meses de abril y mayo, que corresponden a la época de anestro. Se seleccionaron 19 hembras adultas de las razas Hampshire y Suffolk. Para comprobar su estado de anestro se obtuvieron 3 muestras de sangre con intervalo de 4 días para la determinación de progesterona por radioinmunoanálisis en fase sólida (Pulido *et al.*, 1991) presentando todas las ovejas niveles basales de progesterona.

Se formaron al azar 2 grupos: Grupo tratado (n=10) y grupo testigo (n=9). El grupo tratado recibió por vía intravenosa 3 ml de LFE cada 8 h durante 5 días. El grupo testigo recibió solución salina fisiológica en lugar de LFE. Se tomaron muestras de sangre cada 4 h durante el periodo de aplicación de LFE. Las muestras se obtuvieron por venopunción yugular utilizando tubos al vacío heparinizados. Inmediatamente después de la obtención las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos para la separación del plasma, el cual se conservó a -20 °C hasta su análisis.

Se determinaron las concentraciones de FSH utilizando un radioinmunoanálisis heterólogo en fase líquida (Chemineau, 1982). Para el desarrollo del sistema se radioyodó el estándar USDA-bFSH-I2 con el método de Iodo-gen; Se utilizó la hormona USDA-oFSH como estándar y el primer anticuerpo (NIDDK-anti-oFSH) se preparó a una dilución de trabajo de 1:8000. La

separación del complejo antígeno-anticuerpo se realizó por centrifugación a 1500 g a 4 °C durante 30 minutos con la adición previa de una suspensión celular de *Staphylococcus aureus* (Pansorbin cells. Calbiochem, USA) a una concentración de 45 mg/ml (Ruch y Knight, 1980). Bajo estas condiciones el sistema presentó una sensibilidad de 0.25 ng/ml, los coeficientes de variación intra e interensayo para la dosis baja (0.397 ng/ml) fueron de 4.41 % y 12.02 % respectivamente. En el caso de la dosis alta (14.3 ng/ml) los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 3.73 % y 7.13 % respectivamente.

Las concentraciones de FSH se compararon entre grupos mediante análisis de varianza utilizando como variables independientes el tratamiento y la hora en que se tomó la muestra, con el efecto del animal anidado dentro del tratamiento (Steel y Torrie, 1985).

## Experimento 2

El experimento se realizó en los meses de septiembre y octubre, que corresponden a los de plena época reproductiva (Quispe *et al.* 1994). Se utilizaron 22 ovejas adultas que habían presentado 2 estros previos al inicio del experimento. A todas las ovejas se les insertó una esponja intravaginal impregnada con 45 mg de Acetato de Fluorogestona (Chronogest, Intervet, México) para la sincronización del estro. Las esponjas se retiraron 12 días después de la inserción; 2 días antes de remover las esponjas se administró a las ovejas 15 mg de PGF2 $\alpha$  (Lutalyse, UpJohn, México) por vía intramuscular. La detección de estros se realizó 2 veces al día utilizando un macho con mandil. El inicio del estro se consideró como el día 0 del ciclo. En el día 11 del ciclo subsecuente al retiro de la esponja, todas las ovejas se trataron con 15 mg de PGF2 $\alpha$  para provocar la regresión del cuerpo lúteo y permitir el desarrollo folicular preovulatorio. Las ovejas así tratadas se dividieron en 2 grupos: Grupo tratado (n=11) y Grupo testigo (n=11). El grupo tratado recibió 3 ml de LFE por vía intravenosa cada 8 h durante 72 h a partir de la aplicación de la PGF2 $\alpha$  y el grupo testigo recibió 3 ml de solución salina fisiológica en lugar de LFE. A partir de la aplicación de PGF2 $\alpha$  se detectaron estros 3 veces al día (8, 14 y 18 h). El inicio del estro fue considerado cuando la hembra aceptó por primera vez la monta.



Asimismo, se obtuvieron muestras de sangre diariamente a partir del momento de la administración de  $\text{PGF2}\alpha$  y en los siguientes 2 días para la determinación de las concentraciones de progesterona mediante radioinmunoanálisis en fase sólida. Se comparó el intervalo entre la administración de  $\text{PGF2}\alpha$  y la presentación del estro mediante una prueba de t-Student (Steel y Torrie 1985).

## Resultados

### Experimento 1

Las concentraciones de FSH fueron significativamente menores en las ovejas que fueron tratadas con LFE que en las que recibieron solución salina fisiológica (figura 1). Esta diferencia fue más marcada durante las primeras 48 horas posteriores a la administración de LFE.

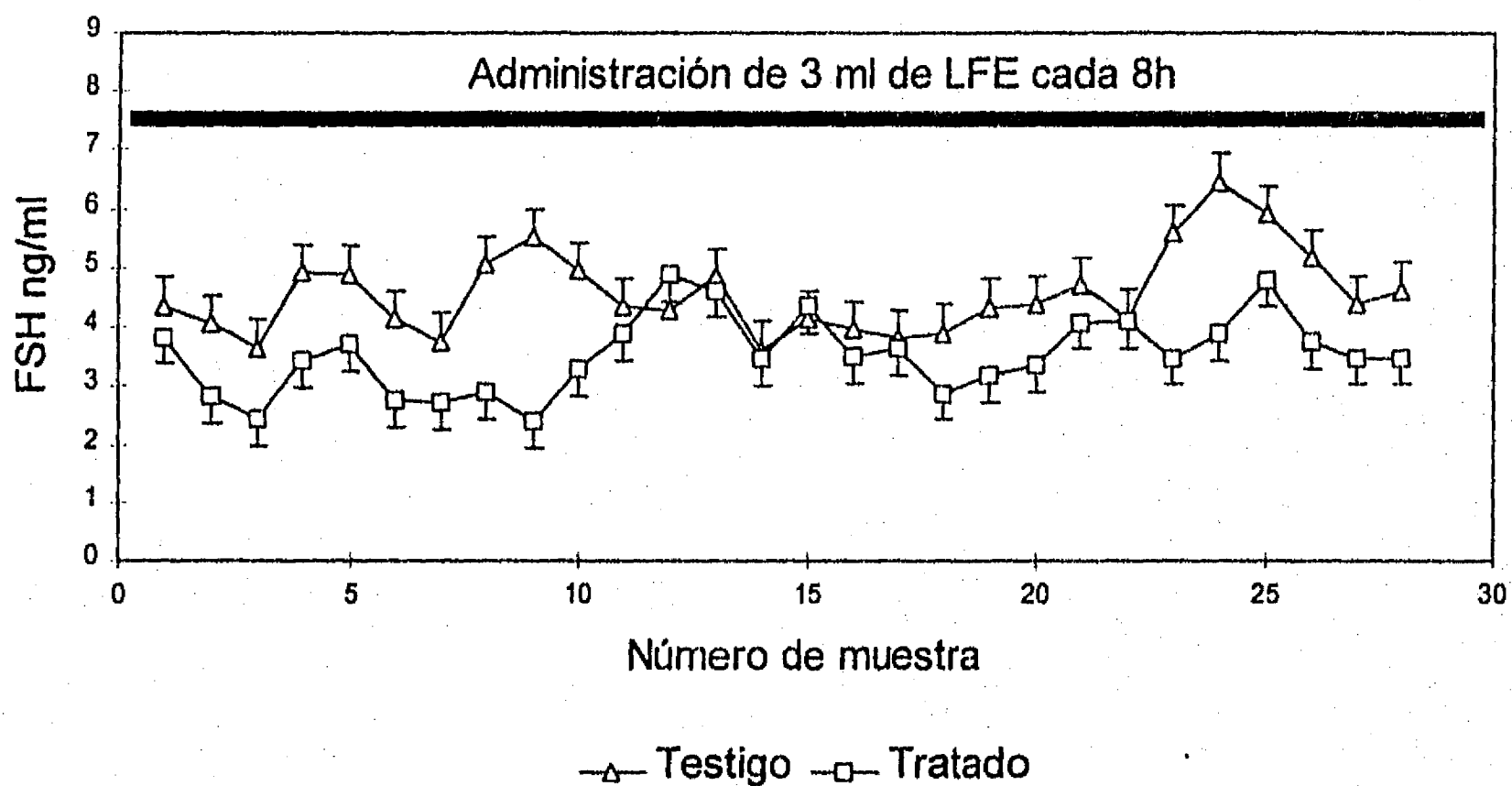


Figura 1. Concentraciones de FSH de ovejas en anestro estacional tratadas con 3 ml de LFE cada 8 h y testigos. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar;  $P < 0.05$ .

### Experimento 2

El 100 % de la ovejas tuvieron un cuerpo lúteo funcional al momento de la administración de la  $\text{PGF2}\alpha$  y sufrieron luteólisis. La concentración promedio de progesterona antes de aplicar la

PGF2 $\alpha$  fue de 2.9  $\pm$ 0.3 ng/ml, mientras que 24 y 48 horas después el promedio fue de 0.38  $\pm$ 0.05 y 0.12  $\pm$ 0.02 ng/ml, respectivamente. El intervalo de la administración de la PGF2 $\alpha$  a la presentación del estro fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) en las ovejas que recibieron LFE (131  $\pm$ 9.9 h) que en las ovejas del grupo testigo (44  $\pm$ 3.91 h) (media  $\pm$ error estandar). En la figura 2 se muestra la distribución de los estros en ambos grupos, observándose que en el grupo testigo todas las ovejas presentaron estro antes de transcurridas 72 horas desde la administración de la PGF2 $\alpha$ , mientras que en el grupo tratado con LFE la mayoría de las ovejas presentaron estro después de las 96 horas ( $P < 0.05$ ).

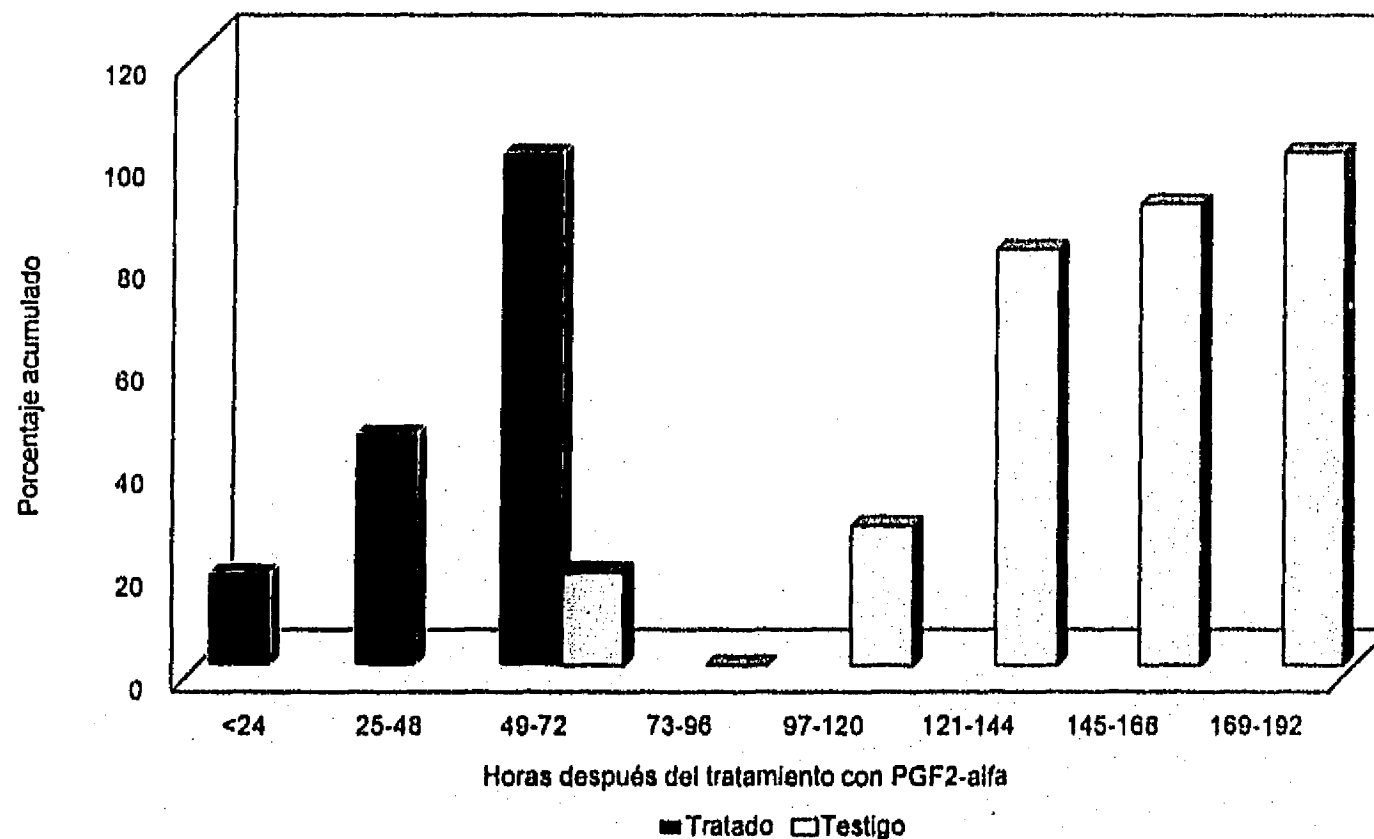


Figura 2. Porcentaje acumulado de ovejas en estro inducido con PGF2 $\alpha$  tratadas con 3 ml de LFE cada 8 h, durante 72 h a partir de la administración de la PGF2 $\alpha$  y testigos.

### Discusión

Las concentraciones de FSH fueron significativamente menores en las ovejas que recibieron LFE durante el anestro que en las testigo. Estos resultados coinciden con los obtenidos con la administración de LFB a ovejas durante el proestro (McNeilly, 1984; McNeilly, 1985), diestro (Wallace y McNeilly, 1985; Larson *et al.*, 1991) y en anestro estacional (McLeod y McNeilly 1987).

El intervalo de la aplicación de la PGF2 $\alpha$  a la presentación del estro fue significativamente ( $P < 0.05$ ) más largo en las ovejas tratadas con LFE que en las testigo ( $131 \pm 9.9$  h y  $44 \pm 3.91$  respectivamente). Estos resultados son similares a los obtenidos por Miller *et al.* (1979b), McNeilly (1984) y MacNeilly (1985), quienes administraron LFB y también observaron un retraso en la presentación del estro en ovejas tratadas con PGF2 $\alpha$ . Miller *et al.* (1979b), demostraron que la prolongación del proestro en estos animales obedece al efecto del LFB sobre el desarrollo folicular. Ellos realizaron laparoscopias en las ovejas tratadas con LFB y observaron una inhibición del desarrollo folicular asociado con el retraso en la presentación del estro.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo utilizando LFE son similares a los conocidos efectos del LFB en ovejas. Además, los resultados obtenidos al tratar ovejas con LFE son similares a los observados en yeguas, en las cuales la administración de LFE retrasa la presentación de estro inducido con PGF2 $\alpha$  (Bergfelt y Ginther, 1985) y suprime la secreción de FSH en yeguas ovariectomizadas (Gremmes, 1990). Esto indicaría que el LFE es una fuente apropiada de actividad de inhibina para realizar investigación en la oveja, lo que confirma la alta homología que tiene la inhibina en las diferentes especies (Knight, 1991).

Por otra parte, existe información que indica que el efecto supresor del LFB sobre el crecimiento folicular no solo es mediado por la FSH ya que en ovejas tratadas con líquido folicular ovino, al cual previamente se le ha retirado la fracción de inhibina, continua inhibiendo el desarrollo folicular (Campbell *et al.* 1991c). De la misma forma Baxter *et al.* (1995), en condiciones *in vitro*, encontraron que el LFB sin inhibina inhibe la proliferación de las células de la granulosa y la producción de estradiol, y proponen que el efecto del LFB en el retraso del estro obedece a un mecanismo a nivel ovárico.

Por otra parte, Law *et al.* (1992) señalan que el LFB sin inhibina suprime el desarrollo folicular y retrasa la presentación del estro en vaquillas. Los anteriores resultados indican que en el líquido folicular existen otros factores, además de la inhibina, que participan en la dinámica folicular y particularmente en los mecanismos de dominancia. En el caso del LFE no

existe información sobre factores diferentes a la inhibina presentes en el LFE que puedan afectar el desarrollo folicular.

Se concluye que el tratamiento con LFE suprime las concentraciones de FSH en ovejas en anestro estacional y retrasa la presentación del estro inducido con prostaglandina F2 $\alpha$ ..

## CAPITULO IV

### **EFFECTO DEL LIQUIDO FOLICULAR EQUINO LIBRE DE ESTEROIDES SOBRE LA SECRECION DE FSH, DESARROLLO FOLICULAR, PRODUCCION DE ESTRADIOL, SECRECION DE PGF<sub>2</sub> $\alpha$ Y DURACION DE LA FASE LUTEA EN OVEJAS EN DIESTRO**

#### **Resumen**

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la administración de líquido folicular equino libre de esteroides (LFE) durante el diestro tardío sobre el desarrollo y función folicular, así como sobre la secreción de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  y la duración de la fase lútea en ovejas. Para tal fin se utilizaron 41 ovejas adultas que se encontraban ciclando. A todas ellas se les insertó una esponja intravaginal impregnada con 45 mg de Acetato de Fluorogestona (Chronogest, Intervet, México) para la sincronización del estro. En el día 11 del ciclo subsecuente al estro sincronizado (día 0=día del estro) se formaron 2 grupos. El grupo tratado (n=24) recibió 3 ml de LFE por vía intravenosa cada 8 h durante 10 días o hasta la presentación del estro. El grupo testigo (n=17) recibió solución salina fisiológica. El LFE se trató previamente con carbón-dextrán para remover la fracción de hormonas esteroides, lo que permitió remover más del 99 % del estradiol y la progesterona presentes originalmente. A partir del día 0 y hasta la presentación del siguiente estro se tomaron muestras de sangre diariamente para la determinación de progesterona en todas las ovejas. A 5 ovejas de cada grupo se les tomaron muestras de sangre para la determinación de FSH cada 2 h a partir del día 12 y hasta la presentación del estro. Se determinaron las concentraciones del metabolito de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (15-ceto-13-14-dihidro-PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) en dos ovejas del grupo tratado en las que se retrasó la regresión del cuerpo lúteo, y en dos del grupo testigo con regresión normal del cuerpo lúteo. En el día 14 del ciclo, 8 ovejas del grupo tratado y 7 del testigo fueron ovariectomizadas; se midieron los folículos visibles y se aspiró el líquido folicular de los folículos más grandes para la determinación de estradiol. Tanto la longitud de la fase lútea como la longitud del ciclo estral fueron mayores ( $P < 0.05$ ) en las ovejas del grupo tratado ( $13.5 \pm 0.53$  y  $19.5 \pm 0.66$  días

respectivamente) que en las del grupo testigo ( $12.2 \pm 0.32$  y  $17.7 \pm 0.26$  días). El diámetro de los folículos y la concentración de estradiol en el líquido folicular fueron significativamente menores ( $P < 0.05$ ) en el grupo tratado ( $2.62 \pm 0.14$  mm;  $4.35 \pm 2.3$  ng/ml), que en el testigo ( $3.42 \pm 0.20$  mm;  $34.8 \pm 12.15$  ng/ml). En las cuatro ovejas se observó un patrón de secreción pulsátil de la  $PGF2\alpha$  entre los días 15 y 16 del ciclo, sin embargo en las ovejas en las que se alargó la fase lútea la frecuencia promedio de los pulsos fue de  $14.6 \pm 1.08$  h, mientras que en las ovejas con regresión normal los pulsos ocurrieron cada  $8 \pm 1.06$  h en promedio (los resultados se presentan como media  $\pm$  error estándar). Se concluye que el tratamiento con LFE durante el diestro suprimió la secreción de FSH, lo que resultó en inhibición del crecimiento folicular y la producción de estradiol, lo que provocó un retraso en la regresión del cuerpo lúteo posiblemente debido a una modificación del patrón de secreción de  $PGF2\alpha$ .

### **Introducción**

La longitud del ciclo estral en la oveja está estrechamente relacionada con la duración de la fase lútea, y particularmente con el momento en que se establece un patrón de secreción pulsátil de Prostaglandina  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ) que provoca la regresión del cuerpo lúteo (Zarco *et al.*, 1988a). La secreción de  $PGF2\alpha$  es regulada por complejas interacciones entre el cuerpo lúteo, los folículos ováricos y el útero. Inicialmente es necesaria una exposición a progesterona durante 10 a 12 días para que aparezcan receptores para estradiol en el endometrio (Lamming *et al.*, 1991; Silvia *et al.*, 1991). Una vez ocurrido esto, el estradiol producido por los folículos antrales, y particularmente por el o los folículos dominantes, estimula en el endometrio la producción de enzimas necesarias para la síntesis de  $PGF2\alpha$  (Hixon y Flint, 1987; Silvia *et al.*, 1991). Además, el estradiol estimula la síntesis de receptores para oxitocina, con lo cual la oxitocina producida por el cuerpo lúteo puede actuar en el útero desencadenando la secreción de  $PGF2\alpha$  (Flint *et al.*, 1990).

La manipulación de los eventos que conducen a la liberación de la  $PGF2\alpha$  puede permitir controlar la longitud de la fase lútea. En este sentido, el lograr retrasar la regresión del cuerpo

lúteo tiene implicaciones prácticas, particularmente en los ciclos que se caracterizan por la formación de cuerpos lúteos de vida corta, como sucede en la primera ovulación posparto, puberal y de la época reproductiva (Hunter, 1991; Bettencourt *et al.*, 1993). También podría tener aplicación en aquellas ovejas a las cuales se les transfiere un embrión de menor edad en relación a la receptora (Mejía, 1995), o en casos de infertilidad en los que el embrión tiene disminuida su capacidad para promover oportunamente el reconocimiento materno de la gestación (Putney *et al.*, 1988; Bazer *et al.*, 1991). Bajo éstas circunstancias, el retraso de la luteólisis proporcionaría más tiempo a los embriones para establecer los mecanismos tendientes a rescatar el cuerpo lúteo, y consecuentemente el porcentaje de gestaciones se favorecería.

La administración de estradiol durante el diestro tardío ocasiona la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  y la luteólisis (Hixon y Flint, 1987), mientras que la supresión de la fuente de estradiol mediante la eliminación física de los folículos ováricos permite retrasar la regresión del cuerpo lúteo tanto en ovejas (Ginther, 1971; Karsch *et al.*, 1970) como en vacas (Villa-Godoy *et al.*, 1985). Una alternativa más práctica para retrasar el inicio de la luteólisis en rumiantes podría ser la supresión del desarrollo folicular mediante la administración de una fuente rica en inhibina (Beard y Hunter, 1994). Esta hormona inhibe la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) a nivel hipofisario (McNeilly, 1984; Baird *et al.* 1991), resultando en la supresión del crecimiento folicular y la producción de estradiol (Wallace y MacNeilly, 1986; McLeod y McNeilly, 1987; Hunter *et al.*, 1988a). Partiendo de estos conceptos, Miquelajauregui (1993) logró retrasar la regresión del cuerpo lúteo en ovejas mediante la administración de líquido folicular bovino libre de hormonas esteroides (LFB), el cual es una fuente rica en inhibina (Knight y Castillo, 1988). Sin embargo, en dicho trabajo no se determinaron los efectos del LFB sobre el desarrollo folicular, producción de estradiol ni secreción de  $\text{PGF2}\alpha$ .

La inhibina también se encuentra en concentraciones elevadas en el líquido folicular equino (LFE) (Roser *et al.*, 1994), y en yeguas se ha logrado suprimir la secreción de FSH y el crecimiento folicular al administrar LFE previamente tratado para remover las hormonas

esteroides (Bergfelt y Ginther, 1985; Gremmes, 1990). Sin embargo, el LFE no se ha utilizado en rumiantes para provocar el mismo efecto, aunque existe evidencia de que la inhibina tiene acción inespecífica (Knight, 1991). El objetivo de éste trabajo fue el de evaluar el efecto de la administración de líquido folicular equino libre de esteroides durante el diestro tardío sobre la secreción de FSH el desarrollo folicular, las concentraciones de estradiol, la secreción de PGF $2\alpha$  y la longitud de la fase lútea de ovejas.

### **Material y Métodos**

El trabajo se realizó en el Centro de Enseñanza Práctica, Investigación y Extensión en Rumiantes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizado en el km 29 de la carretera federal México-Cuernavaca. El clima de la región es tipo c(w) (w)b (ij), que corresponde a semifrío-semihúmedo, con lluvias en verano y precipitación pluvial de 800 a 1200 mm (García 1980).

El experimento se realizó en los meses de septiembre y octubre que corresponden a los de plena época reproductiva en ovinos (Quispe *et al.*, 1994).

#### **Preparación del líquido folicular equino**

El LFE fue colectado de yeguas sacrificadas en un rastro local. Inmediatamente después del sacrificio se succionó en forma estéril el líquido de los folículos visibles, y se conservó en refrigeración hasta llegar al laboratorio. El LFE se centrifugó a 1500 g durante 15 minutos a 4 °C para la separación de detritos. Con el fin de remover las hormonas esteroides, se le adicionaron 10 mg/ml de carbón activado y 0.1 mg/ml de dextrán, permaneciendo en agitación magnética durante 1 hora. Posteriormente, se centrifugó a 1500 g durante 30 minutos a 4 °C para la separación de las partículas de carbón y dextrán. Este procedimiento se repitió 4 veces, y finalmente el sobrenadante se filtró con papel filtro del número 1. Al líquido obtenido de esta forma se le adicionaron 100 UI/ml de penicilina G y se conservó en congelación a -20 °C hasta su utilización (McNeilly, 1984).



La concentración de estradiol y progesterona en el líquido folicular equino antes del tratamiento con carbón-dextrán fue de 760 ng/ml y 124 ng/ml, y después del tratamiento fue de 0.4 ng/ml y 0.02 ng/ml respectivamente, encontrándose que la técnica utilizada permitió remover más del 99 % de ambas hormonas esteroides.

#### Diseño experimental

Se utilizaron 41 ovejas adultas de las razas Hampshire y Suffolk que habían presentado 2 estros previos al inicio del experimento. Las ovejas se sincronizaron mediante la inserción de una esponja intravaginal impregnada con 45 mg de Acetato de Fluorogestona (Chronogest, Intervet, México). Las esponjas se retiraron 12 días después de la inserción; 2 días antes de remover las esponjas se inyectó a las ovejas 15 mg de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (Lutalyse, UpJohn, México) por vía intramuscular. La detección de estros se realizó 2 veces al día utilizando un macho con mandil. El inicio del estro se consideró como el día 0 del ciclo; en el día 11 subsecuente al estro sincronizado se formaron 2 grupos: Grupo tratado (n=24) y Grupo testigo (n=17).

A partir del día 11 (diestro tardío), las ovejas del grupo tratado recibieron 3 ml de LFE por vía intravenosa cada 8 horas durante 10 días o hasta la presentación del estro. El grupo testigo recibió solución salina fisiológica en lugar de LFE.

Se tomaron muestras de sangre para la determinación de progesterona en todas las ovejas diariamente desde el día 0 y hasta la presentación del siguiente estro. La progesterona se determinó mediante radioinmunoanálisis en fase sólida (Pulido *et al.*, 1991). Además, en 5 ovejas de cada grupo se obtuvieron muestras de sangre cada 2 h a partir del día 12 y hasta la presentación del estro. En dichas muestras se determinaron las concentraciones de FSH utilizando un radioinmunoanálisis heterólogo en fase líquida (Chemineau, 1982). Para el desarrollo del sistema se radioyodino el estandar USDA-bFSH-I2 con el método de Iodo-gen; Se utilizó la hormona USDA-oFSH como estándar y el primer anticuerpo (NIDDK-anti-oFSH) se preparó a una dilución de trabajo de 1:8000. La separación del complejo antígeno-anticuerpo se realizó por centrifugación a 1500 g a 4 °C durante 30 minutos con la adición previa de una

suspensión celular de *Staphilococcus aureus* (Pansorbin cells. Calbiochem, USA) a una concentración de 45 mg/ml (Ruch y Knight, 1980). Bajo estas condiciones el sistema presentó una sensibilidad de 0.25 ng/ml, los coeficientes de variación intra e interensayo para la dosis baja (0.397 ng/ml) fueron de 4.41 % y 12.02 % respectivamente. En el caso de la dosis alta (14.3 ng/ml) los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 3.73 % y 7.13 % respectivamente.

En las muestras de 2 ovejas del grupo tratado en las que fue evidente un retraso en la luteólisis, y en dos ovejas del grupo testigo donde se observó una fase lútea de duración normal se determinaron las concentraciones del metabolito de la  $PGF2\alpha$  (15-ceto-13,14 dihidro  $PGF2\alpha$ ; Granström y Kindahl 1982). Todas las muestras se obtuvieron de la vena yugular, utilizando tubos heparinizados al vacío. Después de su obtención las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos para la separación del plasma, el cual se conservó a -20 °C hasta su análisis.

En el día 14 del ciclo, 8 ovejas del grupo tratado y 7 del testigo fueron ovariectomizadas. En los ovarios así obtenidos se contaron y midieron los folículos visibles, y posteriormente se aspiró el líquido de los folículos más grandes. El líquido de los folículos aspirados se diluyó (1:50) con solución salina buferada fosfatada (PBS) para la determinación de la concentración de estradiol por radioinmunoanálisis en fase sólida.

Se consideró el inicio de la fase lútea cuando las concentraciones de progesterona superaron 1 ng/ml, y el final de la misma cuando se redujeron a menos de 1 ng/ml (Zarco *et al.*, 1988a). Se calculó el número de pulsos de  $PGF2\alpha$  y el intervalo entre cada uno de ellos de acuerdo al método descrito por Zarco *et al.*, (1984).

Las concentraciones de progesterona y FSH fueron comparadas mediante análisis de varianza, utilizando el tratamiento y el día del ciclo ó la hora en que fue tomada la muestra como variables independientes, con el efecto del animal anidado dentro del tratamiento. La duración de la fase lútea, la concentración de estradiol y el tamaño folicular fueron comparados a través de una prueba de t-Student (Steel y Torrie, 1985).

## Resultados

### Concentraciones de FSH, estradiol y desarrollo folicular

Las concentraciones de FSH fueron significativamente menores ( $P < 0.05$ ) en las ovejas tratadas con LFE que en las testigos (figura 1). Tanto el diámetro promedio de los folículos ováricos como la concentración de estradiol en el líquido folicular, fueron significativamente menores ( $P < 0.05$ ) en las ovejas del grupo tratado ( $2.62 \pm 0.14$  mm;  $4.35 \pm 2.3$  ng/ml), que en las del testigo ( $3.42 \pm 0.20$  mm;  $34.8 \pm 12.15$  ng/ml; media  $\pm$  error estándar).

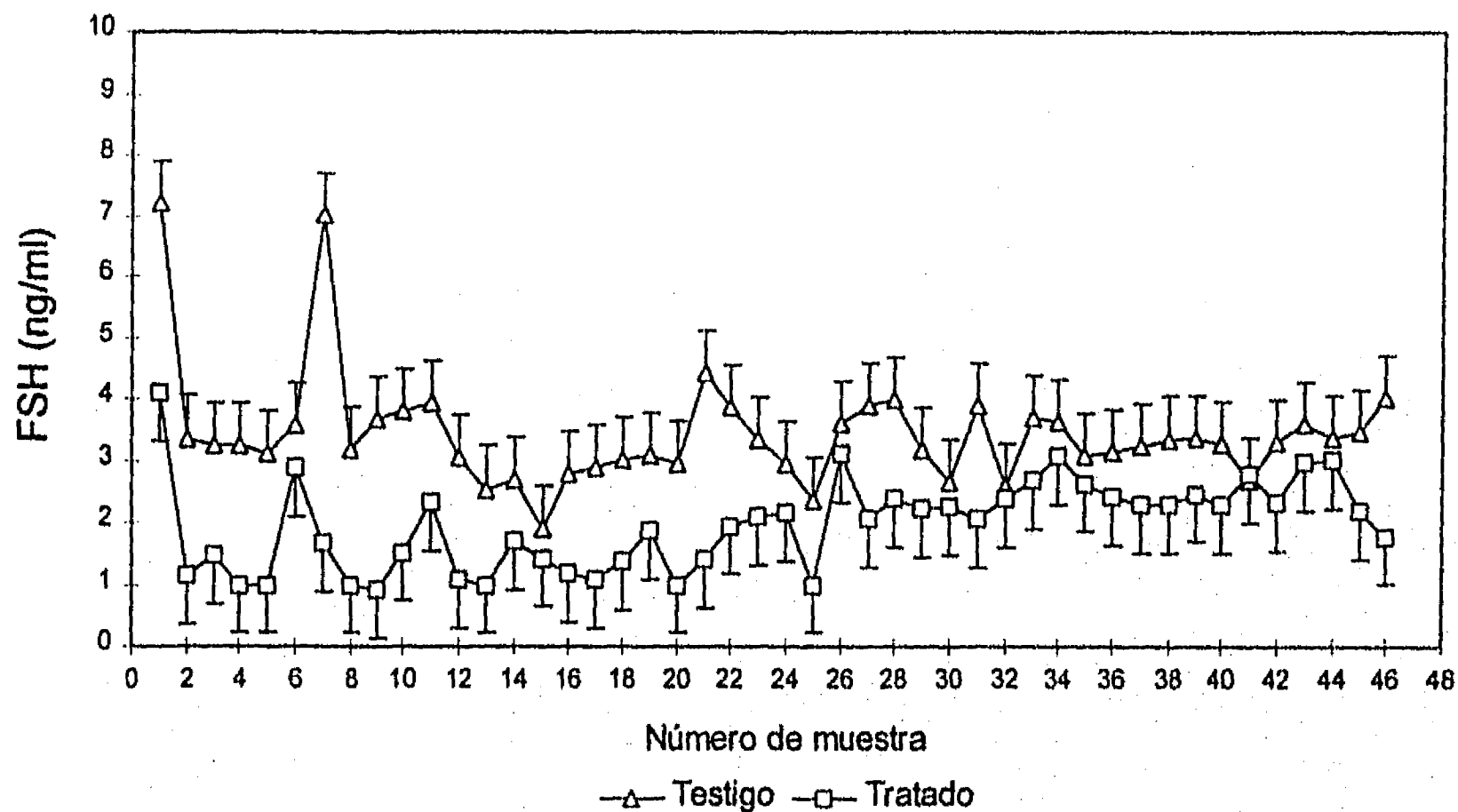


Figura 1. Concentraciones de FSH de ovejas en diestro tratadas con 3 ml de LFE cada 8 h y testigos. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar;  $P < 0.05$ .

### Concentraciones de progesterona y longitud de la fase lútea

Tanto la fase lútea como el ciclo estral fueron más largos ( $P < 0.05$ ) en las ovejas del grupo tratado ( $13.5 \pm 0.53$  y  $19.5 \pm 0.66$  días) que en las del grupo testigo ( $12.2 \pm 0.32$  y  $17.7 \pm 0.26$  días). Al comparar la concentración de progesterona entre los dos grupos durante el periodo de tratamiento, se observó que las ovejas que recibieron LFE tuvieron niveles más elevados

que las testigo; sin embargo esta diferencia sólo fue significativa ( $P < 0.05$ ) en el día 15 del ciclo (cuadro 1 y figura 2).

Cuadro 1. Concentración de progesterona plasmática (ng/ml) de ovejas tratadas a partir del día 11 del ciclo con líquido folicular equino y testigos.

Dia del ciclo	Grupos	
	Tratado (n=16)	Testigo (n=10)
	Media $\pm$ EE	Media $\pm$ EE
0	0.01 $\pm$ 0.18	0.01 $\pm$ 0.23
4	1.27 $\pm$ 0.18	1.12 $\pm$ 0.23
7	2.33 $\pm$ 0.18	2.18 $\pm$ 0.23
11	2.67 $\pm$ 0.18	3.25 $\pm$ 0.23
12	2.62 $\pm$ 0.18	2.76 $\pm$ 0.23
13	3.53 $\pm$ 0.18	2.94 $\pm$ 0.23
14	3.49 $\pm$ 0.18	3.04 $\pm$ 0.23
* 15	2.62 $\pm$ 0.18	1.88 $\pm$ 0.23
16	1.78 $\pm$ 0.18	1.24 $\pm$ 0.23
17	1.03 $\pm$ 0.18	0.40 $\pm$ 0.23
18	0.68 $\pm$ 0.18	0.26 $\pm$ 0.23

\* No se encontraron diferencias estadísticas entre grupos excepto en el día 15 del ciclo estral.

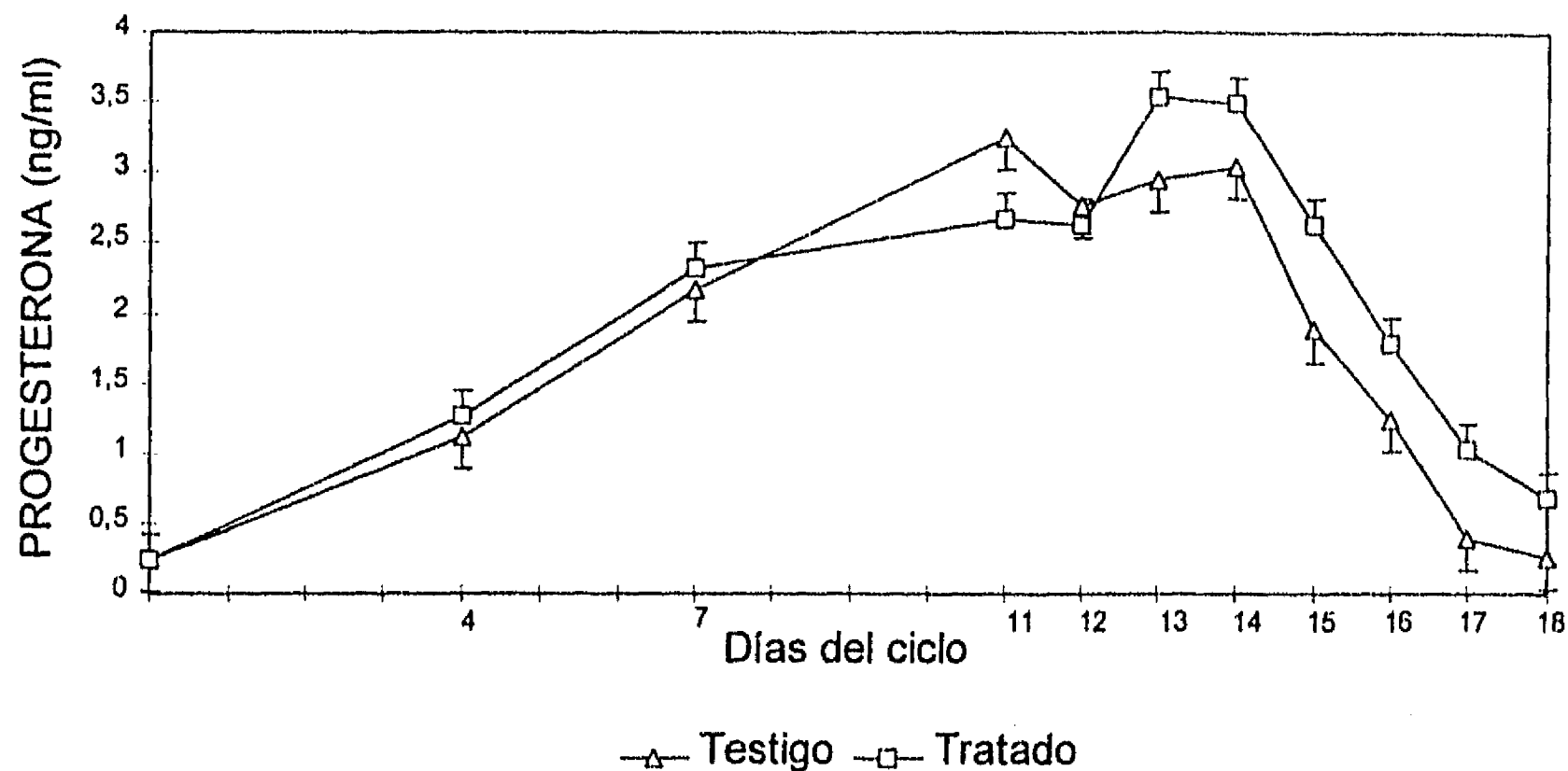
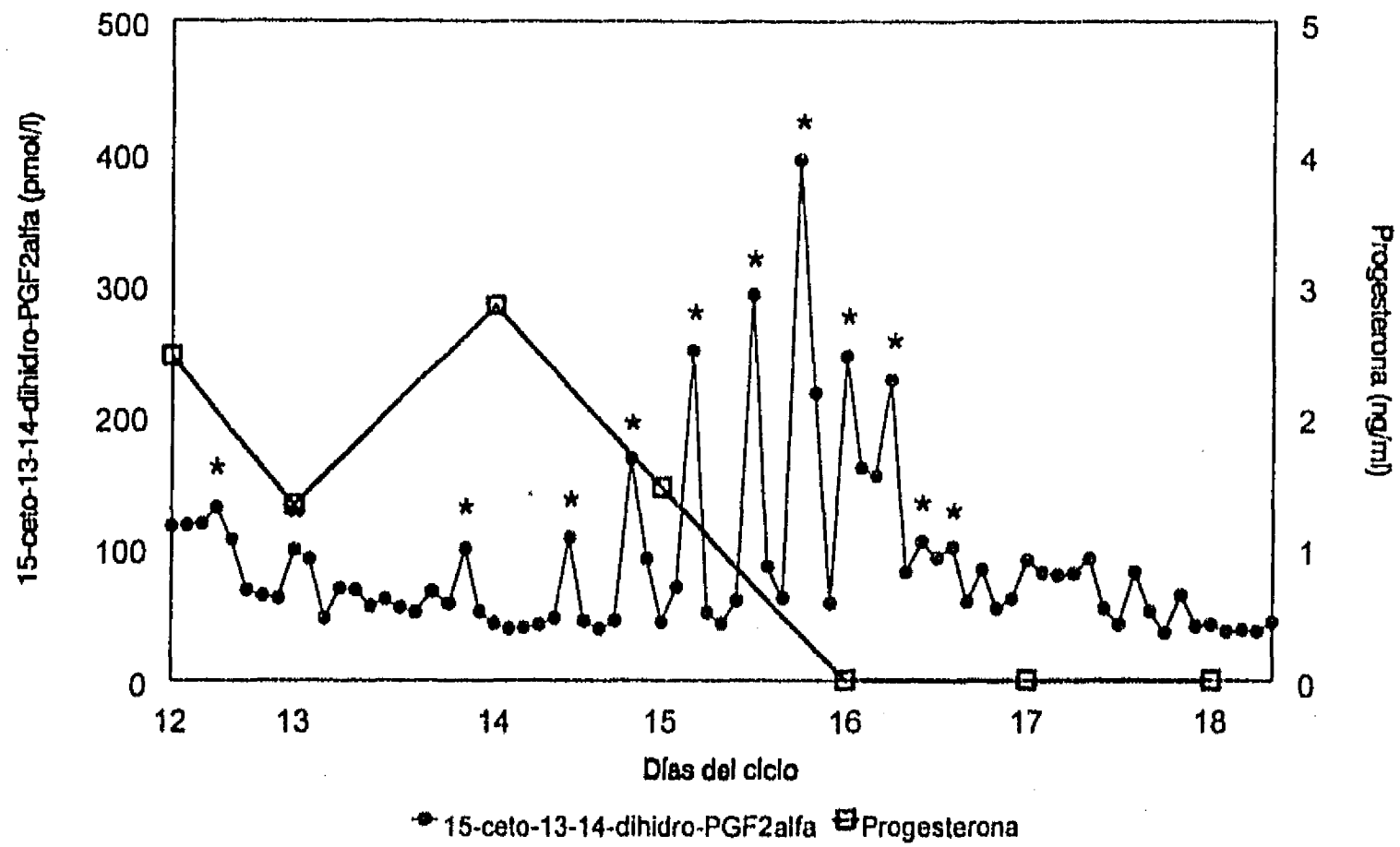


Figura 2. Concentraciones de progesterona de ovejas tratadas con 3 ml de LFE cada 8 h durante el diestro tardío (el tratamiento comenzó el día 11 y se continuó hasta que las ovejas fueron observadas en estro). Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar. Las diferencias solo fueron significativas en el día 15 ( $P < 0.05$ ).

En las cuatro ovejas en las que se determinaron las concentraciones del metabolito de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  se observó un patrón de secreción pulsátil. En las ovejas del grupo testigo en las que ocurrió la regresión normal del cuerpo lúteo se presentaron 5 pulsos de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  durante los días 15 y 16 del ciclo, con un intervalo entre pulsos de  $8 \pm 1.06$  h (figura 3). En contraste, durante los mismos días las ovejas tratadas con LFE que experimentaron prolongación de la fase lútea presentaron 2.5 pulsos de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , secretándose a intervalos de  $14.6 \pm 1.08$  h (figura 4). Sin embargo, posteriormente en ambas ovejas se aceleró la secreción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , lo que coincidió con la regresión del cuerpo lúteo en el día 20 en una de las ovejas (oveja 1231) y en el día 18 en la otra (oveja 57).

### Oveja 56



### Oveja 67

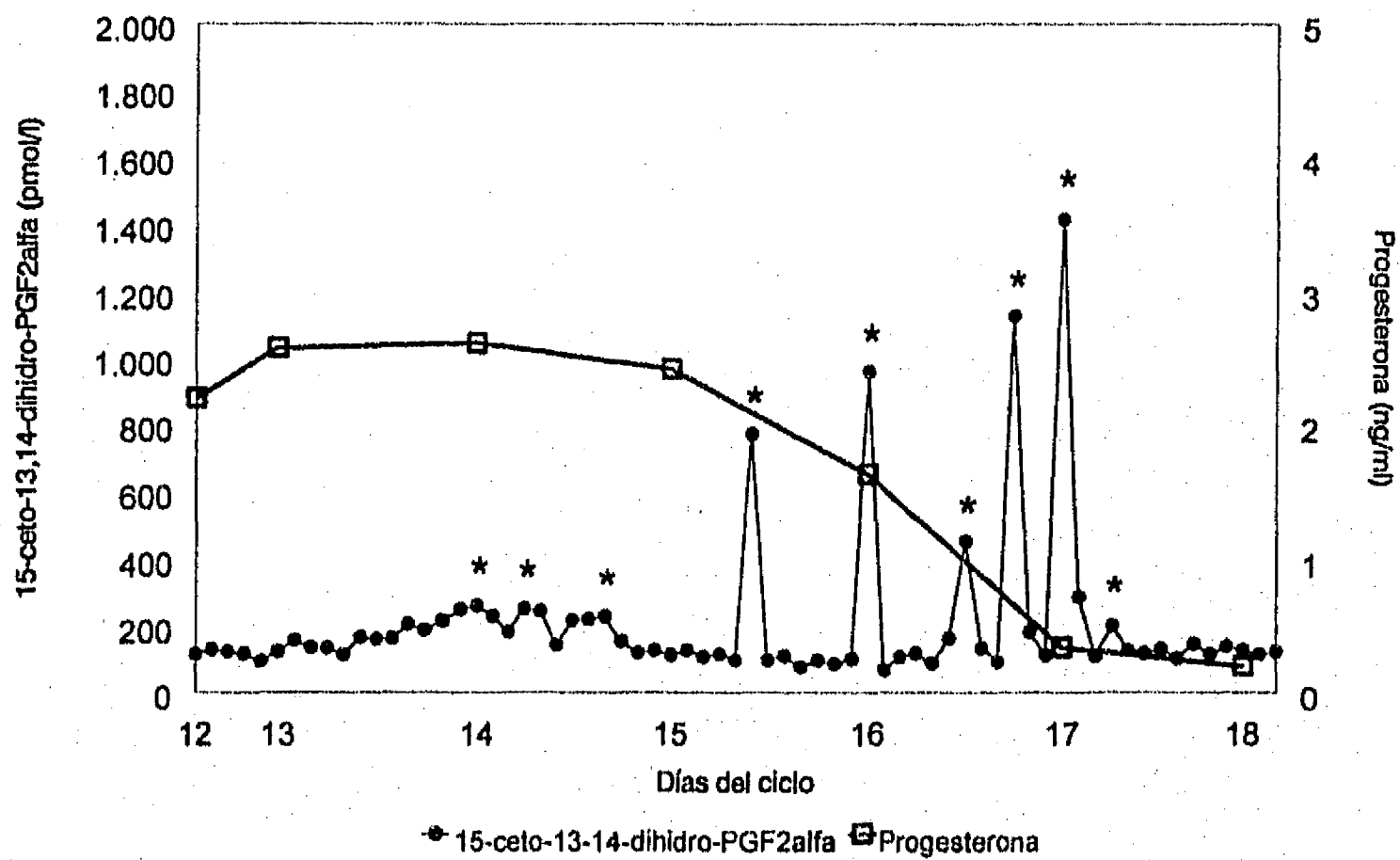
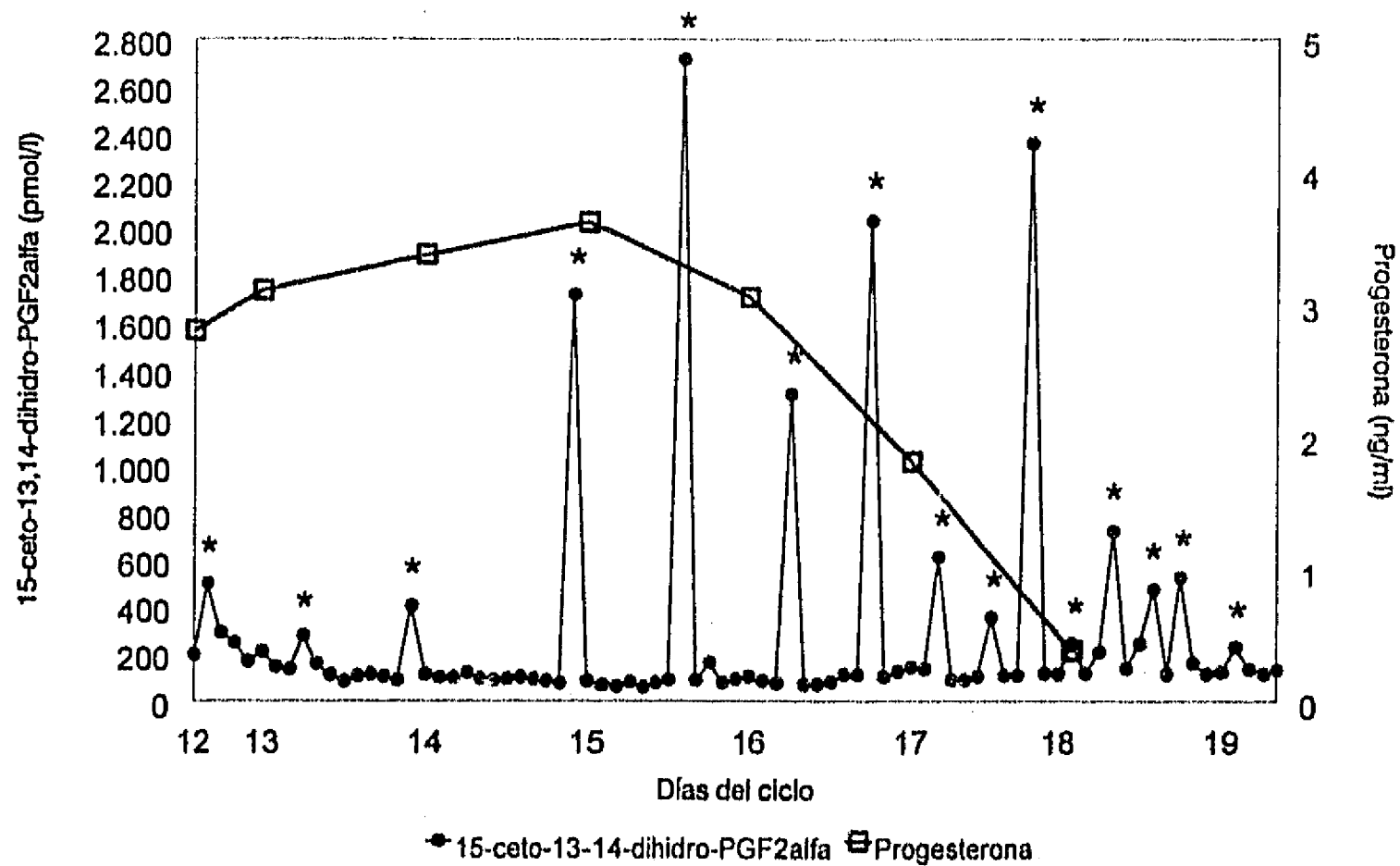


Figura 3. Concentraciones de progesterona y 15-ceto-13-14-dihidro-PGF2 $\alpha$  de ovejas testigos. Los valores señalados con asteriscos indican la presentación de pulsos significativos del metabolito de la PGF2 $\alpha$ .

### Oveja 57



### Oveja 1231

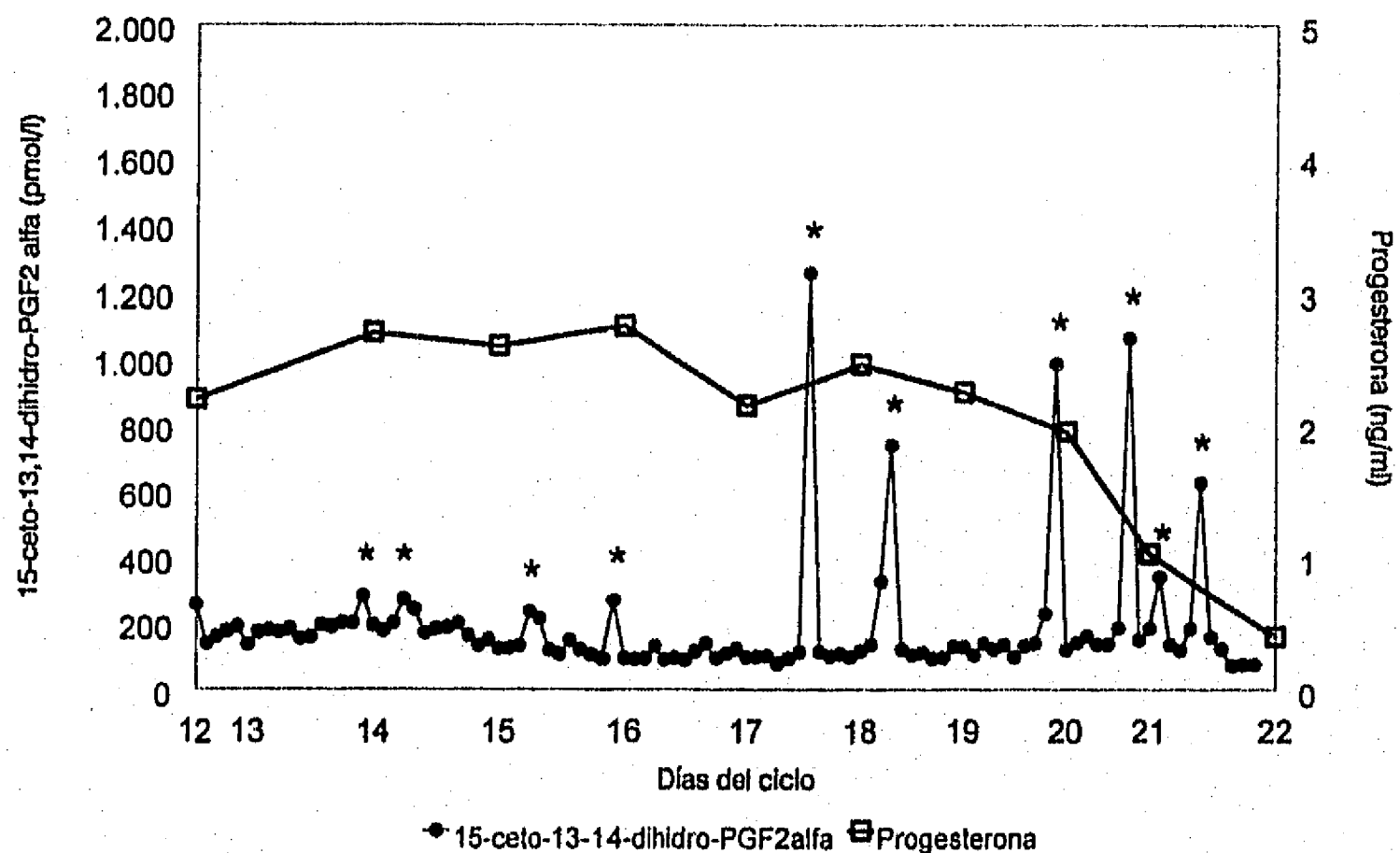


Figura 4. Concentraciones de progesterona y 15-ceto-13-14-dihidro-PGF2 $\alpha$  de ovejas tratadas con 3ml de LFE cada 8 h durante el diestro tardío. Los valores señalados con asteriscos indican la presentación de pulsos significativo del metabolito de la PGF2 $\alpha$ .

## Discusión

El tratamiento con LFE suprimió significativamente la secreción de FSH (figura 1) y el desarrollo folicular. Esto provocó que la concentración de estradiol fuera significativamente menor en los folículos de las ovejas tratadas ( $4.35 \pm 2.3$  ng/ml) que en las testigo ( $34.8 \pm 12.15$  ng/ml). Estos resultados utilizando LFE coinciden con lo observado por Miller *et al.*, (1979b), McNeilly (1984), McLeod y McNeilly (1987) y Hunter *et al.* (1988a), quienes lograron inhibir la secreción de FSH y suprimir el crecimiento folicular y la capacidad estrogénica de los folículos utilizando LFB como fuente de inhibina.

Evidentemente en este trabajo existe una asociación entre la supresión de la secreción de FSH y la reducción del crecimiento folicular y las concentraciones de estradiol. Además, está ampliamente demostrado que la FSH estimula el desarrollo folicular y la capacidad aromatizante del folículo y que en su ausencia se inhiben estos eventos (McNeilly *et al.*, 1992b; Campbell *et al.*, 1995). Sin embargo, no es posible asegurar que los efectos del LFE se hayan debido exclusivamente a su contenido de inhibina, ya que las ovejas fueron tratadas con la fracción proteica del LFE, la cual además de inhibina contiene otros factores con actividad biológica (Findlay, 1993), los cuales pueden regular el desarrollo folicular directamente en el ovario (Campbell *et al.*, 1991c). A este respecto, Baxter *et al.* (1995) encontraron que el LFB libre de inhibina mantiene su capacidad inhibitoria de la proliferación de las células de la granulosa y de la producción de estradiol. Es posible entonces que el efecto del LFE sobre la dinámica folicular sea mediado por un mecanismo sistémico, a través de la inhibición de la secreción de FSH por inhibina, y también por un mecanismo local, regulando el crecimiento folicular a nivel ovárico.

Las ovejas tratadas con LFE tuvieron una fase lútea de mayor duración que las ovejas testigos ( $13.5 \pm 0.53$  y  $12.2 \pm 0.32$  respectivamente) lo que indica que la supresión del desarrollo folicular mediante el tratamiento con LFE si permite retrasar la luteólisis. Estos resultados coinciden con lo observado por Miquelajauregui (1993), quien utilizó LFB para provocar el mismo efecto. Además, se ha logrado evitar la regresión prematura del cuerpo lúteo mediante



la administración de LFB (Beard y Hunter, 1994) o LFE (Balcázar, 1995; Zárate, 1996) en ovejas inducidas a ciclar durante la época de anestro. Beard y Hunter (1994) propusieron que este efecto se debe a la supresión de las concentraciones circulantes de estradiol, lo que es apoyado por los trabajos en los que se eliminan físicamente los folículos ováricos en ovejas (Karsch *et al.*, 1970; Ginther, 1971), y también con los llevados a cabo con vacas en las cuales se eliminan los folículos mediante electrocauterización (Villa-Godoy *et al.*, 1985) o luteinizándolos con GnRH (Macmillan y Thatcher, 1991).

No obstante que las ovejas tratadas tuvieron una fase lútea más larga, ésta prolongación fue apenas de un poco más de un día en promedio. Lo mismo ocurrió cuando Miquelajauregui (1993) utilizó LFB durante el diestro. Esta situación resulta particularmente interesante, ya que el mismo tratamiento en ovejas con fases lúteas cortas evita la regresión prematura (Balcázar, 1995), prolongando la fase lútea durante 7 u 8 días más que en las ovejas no tratadas con LFE. Esta diferencia puede obedecer al tiempo de exposición a progesterona, ya que después de 10 a 12 días de exposición a ésta hormona comienza a secretarse  $\text{PGF2}\alpha$  aún en ovejas ovariectomizadas (Beard y Lamming, 1994). Entonces, es posible que a pesar de la supresión de la concentración de estradiol lograda con el tratamiento con LFE, la duración de la exposición a progesterona determinó finalmente el inicio de la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$ , ya que fue evidente que en el día 14 del ciclo tanto las ovejas tratadas con LFE como las testigo comenzaron a liberar pulsos de  $\text{PGF2}\alpha$ . También en los trabajos de Balcázar (1995) la regresión del cuerpo lúteo finalmente ocurrió en el día 14 o 15 del ciclo, a pesar de que los animales continuaban recibiendo LFE en ese momento.

Otra posibilidad es que los animales se hayan hecho refractarios al LFE después de algunos días de administración de LFE, ya que McNeilly (1984) encontró que después de 40 h de tratamiento con líquido folicular bovino desaparecía el efecto supresor sobre la FSH. Sin embargo, en éste trabajo se observó que el LFE logró reducir las concentraciones de FSH durante las 90 h en las cuales se midió esta hormona. Además, tanto el desarrollo folicular como su contenido de estradiol se encontraban suprimidos en el día 14 del ciclo, cuando los

animales ya estaban comenzando a liberar  $\text{PGF2}\alpha$ . Lo anterior sugeriría que la ausencia de estradiol puede retrasar el inicio de la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  o el establecimiento de un patrón luteolítico de secreción de esta hormona, pero después de una exposición por más de 10 días a concentraciones elevadas de progesterona la secreción luteolítica de  $\text{PGF2}\alpha$  puede iniciarse aún en ausencia de estradiol.

Tanto en las ovejas tratadas con LFE como en las testigo se observó que la  $\text{PGF2}\alpha$  comenzó a secretarse en un patrón pulsátil a partir del día 14, sin embargo en las ovejas tratadas con LFE la frecuencia de los pulsos fue de  $14.6 \pm 1.08$  h entre los días 15 y 16, mientras que en las ovejas testigos los pulsos ocurrieron con un intervalo de  $8 \pm 1.06$  h durante ese mismo período, lo que se asoció con la ocurrencia de la luteólisis. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Zarco *et al.* (1988a) quienes observaron que para que se lleve a cabo la luteólisis se necesita que los pulsos ocurran con una frecuencia de un pulso cada 8 h. En contraste una disminución en la frecuencia de secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  provoca falla en la luteólisis, como sucede en las ovejas que presentan persistencia espontánea del cuerpo lúteo, donde se observa un pulso cada 16 h (Zarco *et al.*, 1984).

La modificación de la frecuencia de los pulsos observada en este trabajo es similar a la encontrada por Zhang *et al.* (1991), quienes suprimieron las concentraciones de estradiol mediante irradiación de los folículos ováricos y vieron que la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  no se eliminaba, pero el intervalo entre pulsos se alargó, retrasando de esta forma la regresión del cuerpo lúteo. Lo anterior confirma que el papel del estradiol en la síntesis de receptores a oxitocina durante el establecimiento de la secreción pulsátil de  $\text{PGF2}\alpha$  (Flint *et al.* 1990) puede ser un papel facilitador del reciclaje de receptores de oxitocina más que un requerimiento absoluto para la síntesis de los mismos (Zhang *et al.* 1991).

En las dos ovejas tratadas con LFE en las que se midió  $\text{PGF2}\alpha$  la frecuencia de secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  eventualmente se aceleró, coincidiendo con la regresión lútea. Esto coincide por lo observado por Zarco *et al.* (1988a) en ovejas con ciclos estrales largos (18 o 19 días), en las que comienza a secretarse  $\text{PGF2}\alpha$  en forma poco frecuente en el día 14 o 15 sin resultar en la

regresión del cuerpo lúteo, lo que solo ocurre cuando finalmente se acelera la secreción de esta hormona.

Se concluye que el tratamiento con LFE durante el diestro redujo las concentraciones de FSH, suprimió el crecimiento folicular y la producción de estradiol, y retrasó la regresión del cuerpo lúteo, posiblemente debido a la modificación del patrón de secreción pulsátil de  $\text{PGF2}\alpha$ .

## CAPITULO V

### SECRECIÓN DE LA PROSTAGLANDINA F2 $\alpha$ EN OVEJAS CON FASES LUTEAS CORTAS TRATADAS CON LIQUIDO FOLICULAR EQUINO LIBRE DE ESTEROIDES

#### Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar si el líquido folicular equino libre de esteroides (LFE) evita la regresión prematura del cuerpo lúteo mediante la modificación de la secreción de prostaglandina F2 $\alpha$ . Para ello, se provocó la ovulación en 12 ovejas en anestro estacional mediante la administración intramuscular de 1000 UI de hCG. A 5 de las ovejas se les administraron 3 ml de LFE por vía intravenosa cada 8 horas durante diez días, comenzando 3 días después de la aplicación de hCG. Las 7 ovejas restantes formaron el grupo testigo y recibieron solución salina fisiológica. A partir del día 4 se obtuvieron muestras de sangre de todas las ovejas cada 2 horas durante 5 días para la determinación de las concentraciones del metabolito de la PGF2 $\alpha$  (15-ceto-13,14 dihidro PGF2 $\alpha$ ). Se calculó el número promedio de pulsos de PGF2 $\alpha$  y el intervalo entre cada uno de ellos durante los días 4 y 5 del ciclo inducido. En 5 ovejas de cada grupo se determinaron las concentraciones de FSH del día 3 al 6 en muestras tomadas cada 4 horas. Además, en 3 muestras al día se determinaron las concentraciones de progesterona. Las 5 ovejas del grupo tratado con LFE tuvieron cuerpos lúteos de duración normal (11.8  $\pm$ 0.9 días) y las 7 ovejas del grupo testigo presentaron cuerpos lúteos de corta duración (3.4  $\pm$ 0.2 días). Las concentraciones de FSH fueron significativamente menores ( $P < 0.05$ ) en las ovejas que recibieron LFE en comparación a las del grupo testigo. No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) en el número de pulsos de PGF2 $\alpha$  entre las ovejas tratadas con LFE y aquellas con regresión prematura del cuerpo lúteo (3.8  $\pm$ 0.4 y 4.7  $\pm$ 0.5, respectivamente), sin embargo, sí existieron diferencias ( $P < 0.05$ ) en el intervalo entre los pulsos; las ovejas tratadas con LFE tuvieron un intervalo entre pulsos de 16.2  $\pm$ 1.2 horas, mientras que en las ovejas con regresión prematura el intervalo fue de 8.0  $\pm$ 0.9 horas. Se concluye que la regresión prematura de los cuerpos lúteos de ovejas inducidas a ovular

durante la época de anestro estacional es provocada por la secreción pulsátil de  $\text{PGF2}\alpha$ , y el tratamiento con líquido folicular equino libre de esteroides altera la frecuencia de secreción de la  $\text{PGF2}\alpha$ , lo que puede evitar la regresión prematura del cuerpo lúteo.

### Introducción

En la oveja se desarrollan cuerpos lúteos de vida corta en la primera ovulación que se presenta al llegar a la pubertad (Rodríguez, 1991), al iniciarse la estación reproductiva (Oldham y Martin, 1979), en la primera ovulación posparto (Braden *et al.*, 1989a), así como en las ovulaciones inducidas durante la época de anestro con la hormona liberadora de gonadotropinas o con la gonadotropina coriónica humana (McLeod *et al.*, 1982a; Hunter *et al.*, 1989). Estos cuerpos lúteos se caracterizan por generar elevaciones transitorias de progesterona que rara vez llegan a ser mayores de 1 ng/ml, y porque la regresión lútea ocurre entre el día 4 y 5 después de la ovulación (Beard y Hunter, 1994; Balcázar, 1995).

Los cuerpos lúteos de vida corta tienen las mismas características morfofisiológicas que los cuerpos lúteos normales, de tal forma que el número de receptores para la hormona luteinizante y para la prostaglandina  $\text{F2}\alpha$ , así como la proporción y capacidad esteroidogénica de las células lúteas grandes y chicas es similar en ambos tipos de cuerpo lúteo (Braden *et al.*, 1989a). Existe evidencia de que la regresión prematura obedece a una liberación anticipada de  $\text{PGF2}\alpha$ , presentándose la luteólisis por secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  en forma similar a la que ocurre al final de una fase lútea normal (Hunter *et al.*, 1989; Silvia *et al.*, 1991).

La causa de la liberación prematura de  $\text{PGF2}\alpha$  no se conoce totalmente, sin embargo en estas ovejas se ha observado que aparecen prematuramente receptores para estradiol en el endometrio (Garverick *et al.*, 1992). Además, las ovejas con cuerpos lúteos de corta duración tienen en el día 5 después de la ovulación una alta concentración de receptores para oxitocina en comparación a las ovejas que desarrollan cuerpos lúteos normales (Hunter, 1991).

La supresión de las concentraciones de estradiol en los días en que ésta hormona es necesaria para que se establezca la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  permite retrasar la luteólisis (Zhang

*et al.*, 1991), de tal forma que la eliminación de los folículos ováricos en el diestro tardío alarga la fase lútea (Karsch *et al.*, 1970; Ginther, 1971). Beard y Hunter (1994) utilizaron una fuente rica en inhibina, como lo es el líquido folicular bovino libre de esteroides (LFB), para suprimir la secreción de FSH y consecuentemente inhibir el desarrollo folicular y reducir las concentraciones de estradiol en ovejas anéstricas inducidas a ovular, y de esta forma evitaron la regresión lútea prematura. Asimismo, observaron que las ovejas tratadas con LFB y que además recibieron estradiol exógeno tuvieron luteólisis prematura, lo que confirma que el estradiol desencadena los eventos que conducen a la liberación prematura de  $\text{PGF2}\alpha$ . De la misma forma, Balcázar (1995) administró líquido folicular equino libre de esteroides (LFE), el cual también es una fuente rica en inhibina (Roser *et al.*, 1994), a ovejas anéstricas inducidas a ovular con hCG, y evitó la regresión prematura del cuerpo lúteo hasta en un 76% de ellas.

Si bien existe evidencia de que la supresión de las concentraciones de estradiol mediante la administración de líquido folicular equino evita la regresión prematura, se desconoce la forma en que se modifica la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$ , por tal motivo el objetivo de este trabajo fue el de conocer las características de la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  en ovejas anéstricas inducidas a ovular con hCG y que fueron tratadas con líquido folicular equino libre de esteroides.

### **Material y Métodos**

El trabajo se realizó en el Centro de Enseñanza Práctica, Investigación y Zootecnia perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizado en el km 29 de la carretera federal México-Cuernavaca. El clima de la región es tipo c(w) (w)b (ij), que corresponde a semifrío-semihúmedo, con lluvias en verano y precipitación pluvial de 800 a 1200 mm (García, 1980). El experimento se realizó en los meses de marzo a abril, que corresponden a la época de anestro (Quispe, *et al.*, 1994).

#### **Obtención y procesamiento del LFE**

El LFE se colectó de yeguas sacrificadas en un rastro local. Inmediatamente después del sacrificio se succionó el líquido de los folículos visibles y se conservó en refrigeración hasta su

traslado al laboratorio donde se centrifugó a 1500 g durante 15 minutos a 4 °C para la separación de detritos. Con el fin de remover las hormonas esteroides, se adicionaron 10 mg/ml de carbón activado y 0.1 mg/ml de dextrán, manteniéndose en agitación magnética durante 1 hora. Posteriormente, se centrifugó a 1500 g durante 30 minutos a 4 °C para la separación de las partículas de carbón y dextrán. Este procedimiento se repitió 4 veces, y finalmente el sobrenadante se filtró con un filtro de papel del número 1. Al líquido obtenido de esta forma se le adicionaron 100 UI/ml de penicilina G y se conservó en congelación a -20 °C hasta su utilización (McNeilly, 1984).

La concentración de estradiol y progesterona en el líquido folicular equino antes del tratamiento con carbón-dextrán fue de 760 ng/ml y 124 ng/ml, y después del tratamiento fue de 0.4 ng/ml y 0.02 ng/ml respectivamente, encontrándose que la técnica utilizada permitió remover más del 99 % de ambas hormonas esteroides.

#### Diseño experimental

Se utilizaron 12 ovejas en anestro estacional, de diferente número de parto y de las razas Hampshire y Suffolk. Se provocó la ovulación mediante la administración de 1000 UI de hCG en una sola aplicación por vía intramuscular (día 0) (Balcázar, 1995). A 5 de las ovejas (Grupo tratado) se les administraron 3 ml de LFE por vía intravenosa cada 8 horas durante diez días, comenzando 3 días después de la aplicación de la hCG (Balcázar, 1995). Las 7 ovejas restantes (Grupo testigo) recibieron solución salina fisiológica en lugar de LFE.

A todas las ovejas se les tomaron muestras de sangre 3 veces al día comenzando un día después de la administración de la hCG. A partir del día 4 se les comenzaron a tomar muestras de sangre cada 2 horas durante 5 días. Las muestras se obtuvieron por venopunción yugular utilizando tubos al vacío heparinizados. Inmediatamente después de la obtención las muestras se centrifugaron a 3000 revoluciones por minuto durante 10 minutos para la separación del plasma, el cual fue conservado en congelación hasta su análisis.

### Determinaciones hormonales

En todas las muestras obtenidas cada 2 h se determinaron las concentraciones del metabolito de la  $\text{PGF2}\alpha$  (15-ceto-13,14 dihidro  $\text{PGF2}\alpha$ ) por radioinmunoanálisis, de acuerdo al método descrito por Granström y Kindahl (1982). Además, en 5 ovejas de cada grupo se cuantificaron las concentraciones de FSH mediante un radioinmunoanálisis heterólogo en fase líquida (Chemineau, 1982), en muestras tomadas cada 4 horas desde el día 3 al día 6. Finalmente, en 3 muestras al día se determinaron las concentraciones de progesterona (Pulido, *et al.*, 1991).

### VARIABLES EVALUADAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calculó la duración de la fase lútea y se consideró que un cuerpo lúteo tuvo vida normal si las concentraciones de progesterona se mantuvieron por encima de 1 ng/ml por más de 9 días, y de vida corta si las concentraciones de progesterona se elevaron a más de 0.5 ng/ml pero no llegaron a rebasar 1 ng/ml, o sólo lo hicieron durante periodos de 8 días o menos.

Se calcularon el número de pulsos de  $\text{PGF2}\alpha$  y el intervalo entre cada uno de ellos durante los días 4 y 5 (cuando ocurrió la regresión de los cuerpos lúteos de las ovejas no tratadas con LFE) de acuerdo al método descrito por Zarco *et al.* (1984). El número de pulsos y la duración de la fase lútea se compararon entre grupos mediante una prueba de t-Student. El intervalo entre pulsos se comparó mediante análisis de varianza, utilizando como variable independiente el tratamiento, y el efecto del animal anidado dentro del tratamiento. Las concentraciones de FSH se compararon mediante análisis de varianza utilizando como variables independientes el tratamiento y la hora en que se tomó la muestra, con el efecto del animal anidado dentro del tratamiento (Stell y Torrie, 1985).

### Resultados

Las concentraciones de FSH fueron significativamente menores ( $P < 0.05$ ) en las ovejas que recibieron LFE en comparación a las del grupo testigo (figura 1).



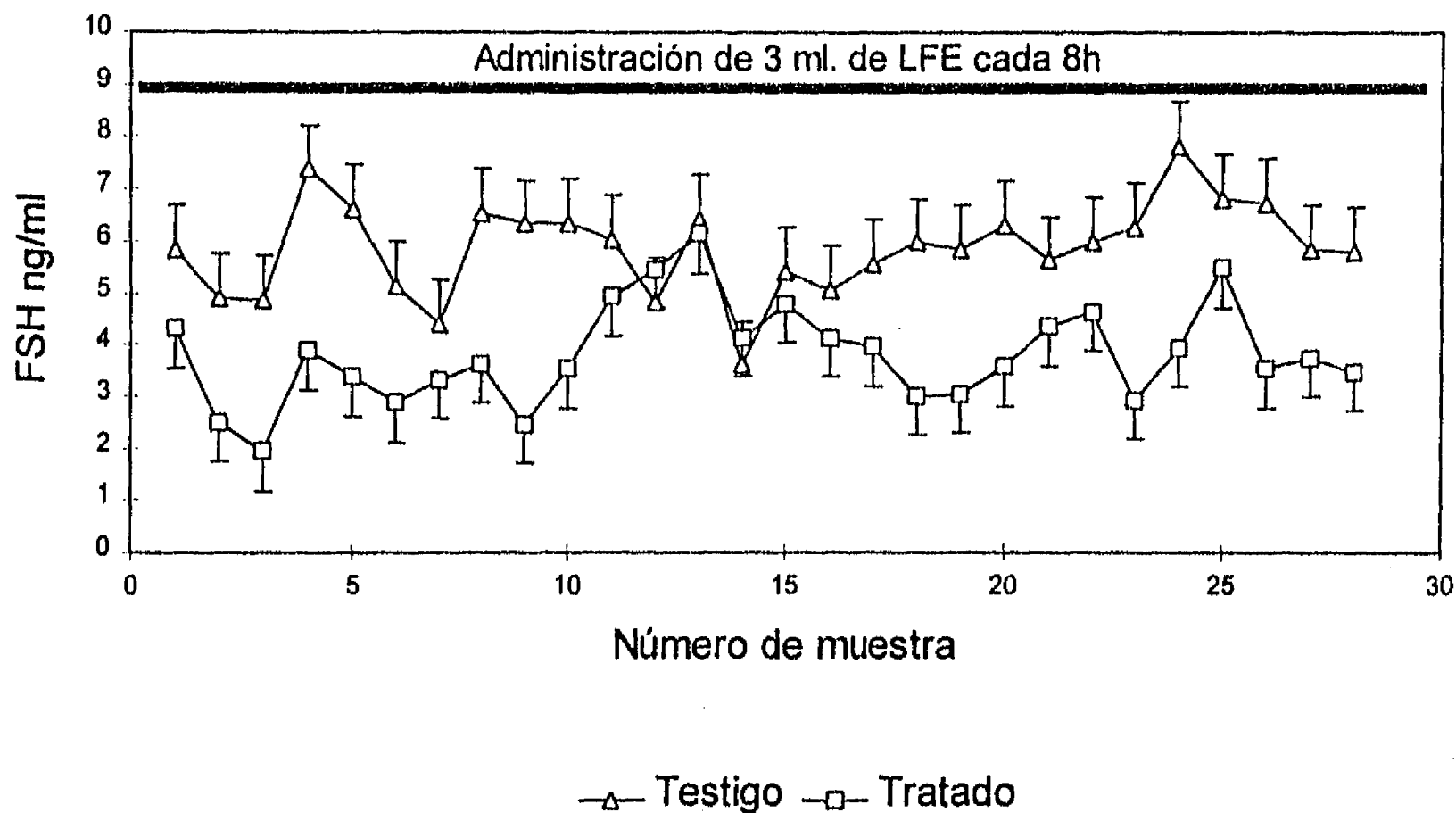


Figura 1. Concentraciones de FSH de ovejas en anestro estacional tratadas con 3 ml de LFE cada 8 h y testigos. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar;  $P < 0.05$ .

Las 5 ovejas del grupo tratado con LFE tuvieron cuerpos lúteos normales y las 7 del grupo testigo presentaron cuerpos lúteos de vida corta. La duración de la fase lútea en las ovejas tratadas con LFE fue de  $11.8 \pm 0.9$  días y para el grupo testigo de  $3.4 \pm 0.2$  (media  $\pm$  error estándar;  $P < 0.05$ ).

El número de pulsos de PGF<sub>2a</sub> fue similar en las ovejas tratadas con LFE y en aquellas con regresión prematura del cuerpo lúteo ( $3.8 \pm 0.4$  y  $4.7 \pm 0.5$ , respectivamente;  $P > 0.05$ ). Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) en el intervalo entre los pulsos; las ovejas tratadas con LFE tuvieron un intervalo entre pulsos de  $16.2 \pm 1.2$  h, mientras que en las ovejas con regresión prematura el intervalo fue de  $8.0 \pm 0.9$  h (media  $\pm$  error estándar).

Cuadro 1. Características de la secreción de la PGF2a y duración de la fase lútea de ovejas en anestro estacional inducidas a ovular con hCG tratadas con LFE y testigos ab.

Grupos	Secreción de PGF2a		
	Número de pulsos	Intervalo entre pulsos	Duración de la fase lútea
Tratado (n=5)	3.8±0.4a	16.2±1.2a	11.8±0.9a
Testigo (n=7)	4.7±0.5a	8±0.9b	3.4±0.2b

a) Los datos se presentan como media ± error estandar

b) Valores con diferente literal en la misma columna indica que existen diferencias estadísticas (P< 0.05).

En las figuras 2 a 6 se observa que en las ovejas tratadas con LFE las concentraciones de progesterona se elevan continuamente a partir de la administración de hCG, superando una concentración de 1 ng/ml entre el día 3 y 5 post-inyección, y manteniendo elevadas las concentraciones de progesterona. Los pulsos de PGF2 $\alpha$  en estas ovejas están presentes pero a intervalos muy largos. En cambio, en las ovejas no tratadas con LFE (figuras 7 a 13) las concentraciones de progesterona se elevan hasta el día 3, después de lo cual ocurre la regresión del cuerpo lúteo, por lo que las concentraciones de progesterona bajan a niveles basales, permaneciendo bajas (figuras 7,9,13) o volviéndose a elevar en el día 6 o 7 como resultado de una nueva ovulación (figuras 8,10,11,12). En las ovejas de este grupo existe una frecuente secreción pulsátil de PGF2 $\alpha$  asociada con la regresión del cuerpo lúteo.

Figura 2. Oveja 69

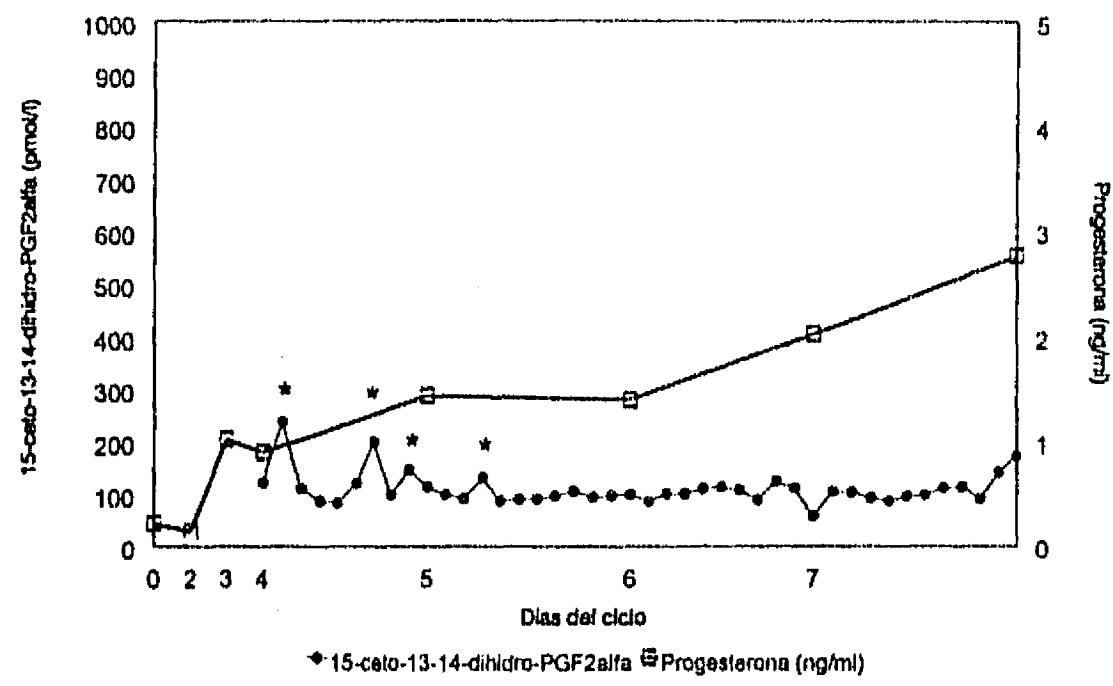


Figura 3. Oveja 76

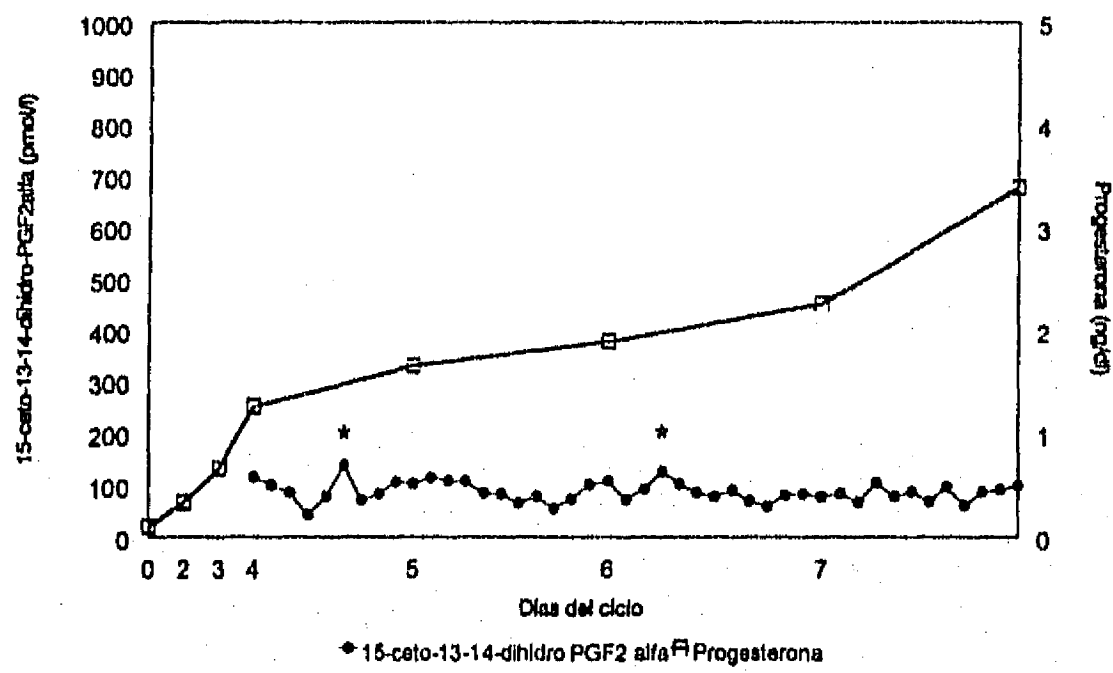


Figura 4. Oveja 85

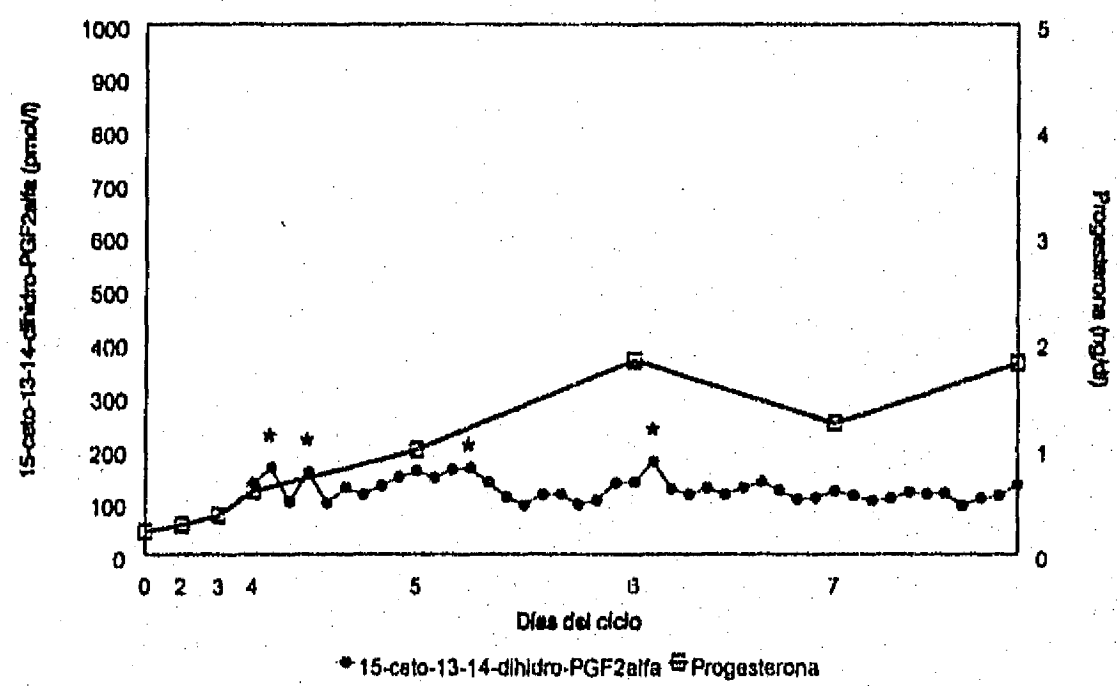


Figura 5. Oveja 87

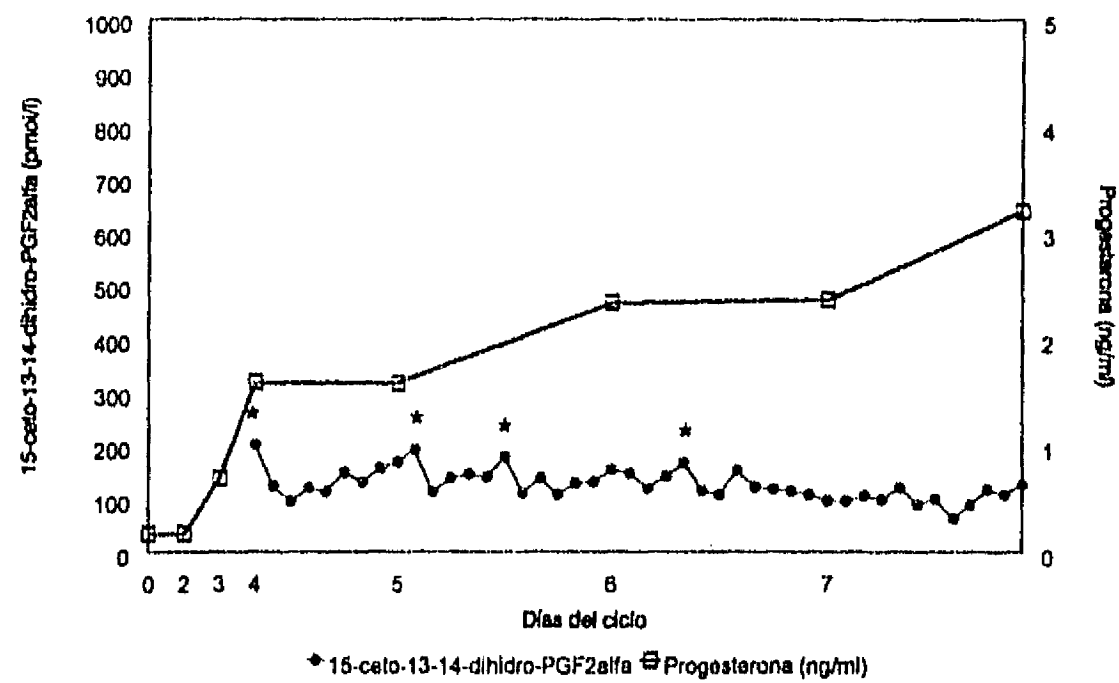
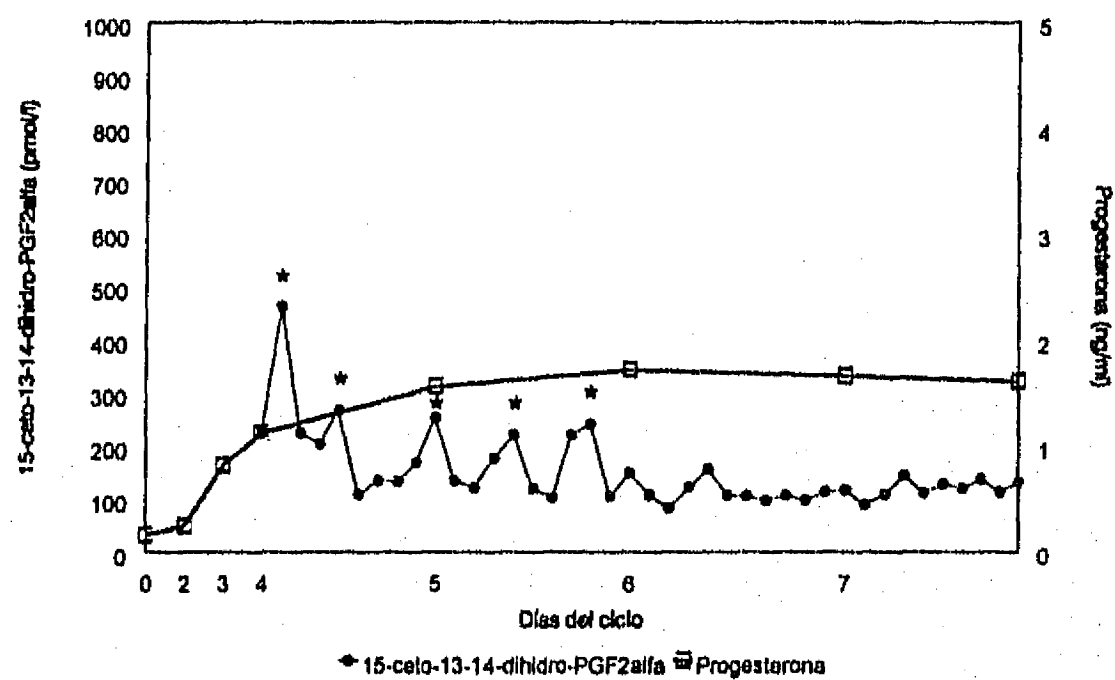


Figura 6. Oveja 108



Figuras 2 a 6. Concentraciones de progesterona y 15-ceto-13-14-dihidro-PGF $2\alpha$  de ovejas en anestro estacional inducidas a ovular con hCG, tratadas con 3 ml de LFE cada 8 h durante 10 días. Los valores señalados con asteriscos indican la presentación de pulsos significativos del metabolito de la PGF $2\alpha$ .

Figura 7. Oveja 70

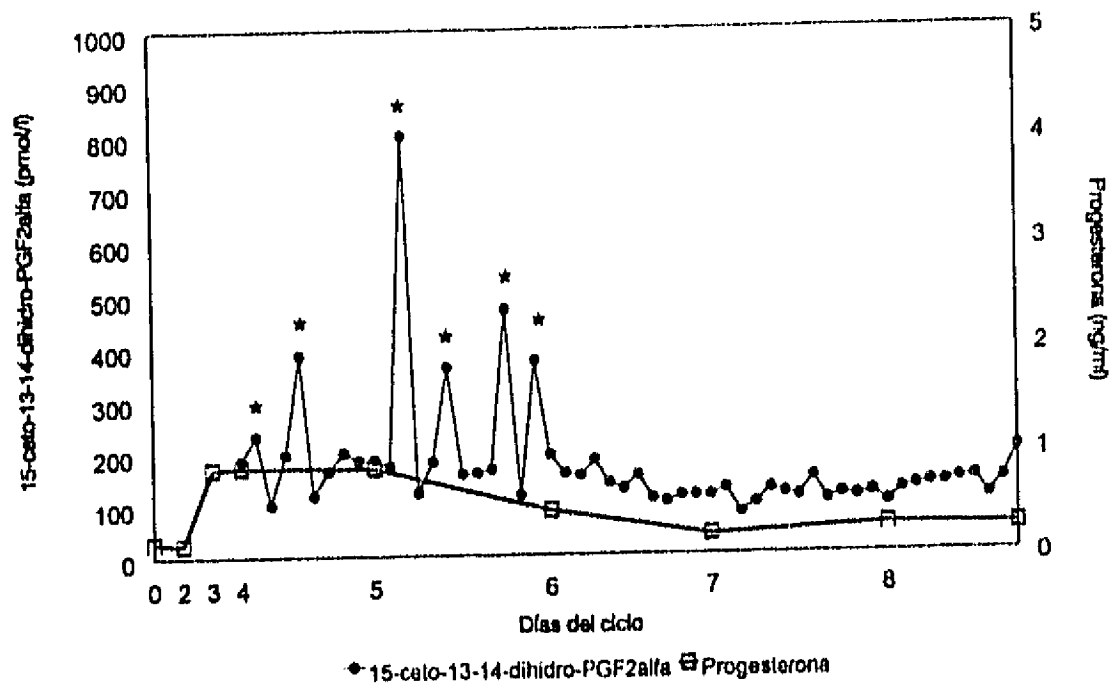


Figura 8. Oveja 80

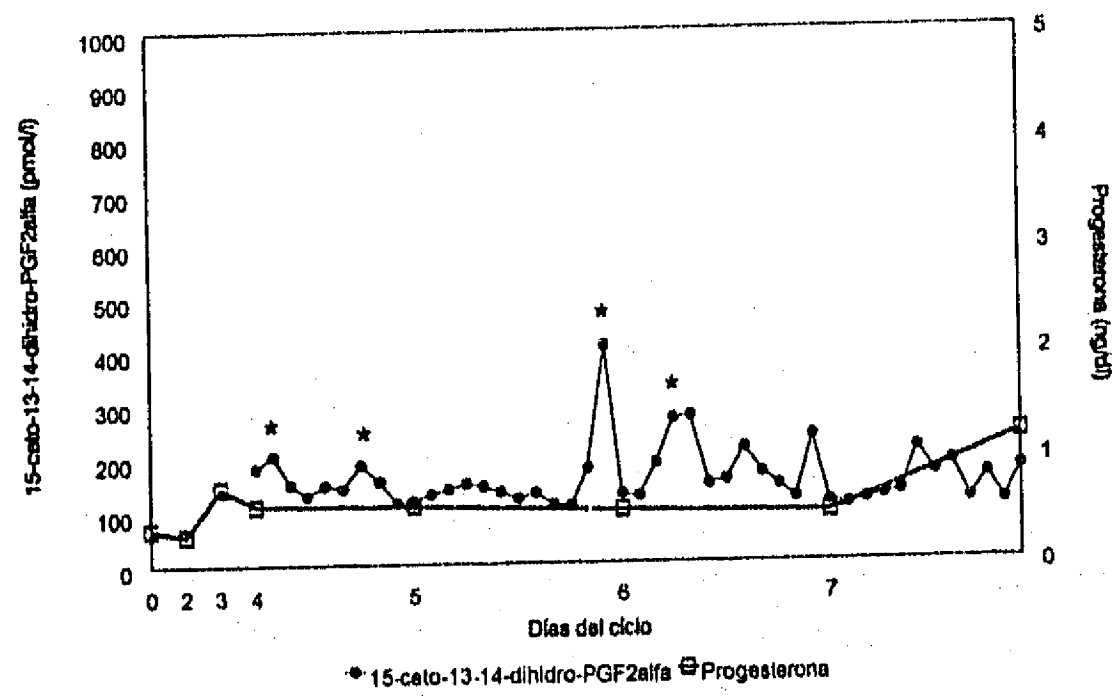


Figura 9. Oveja 90

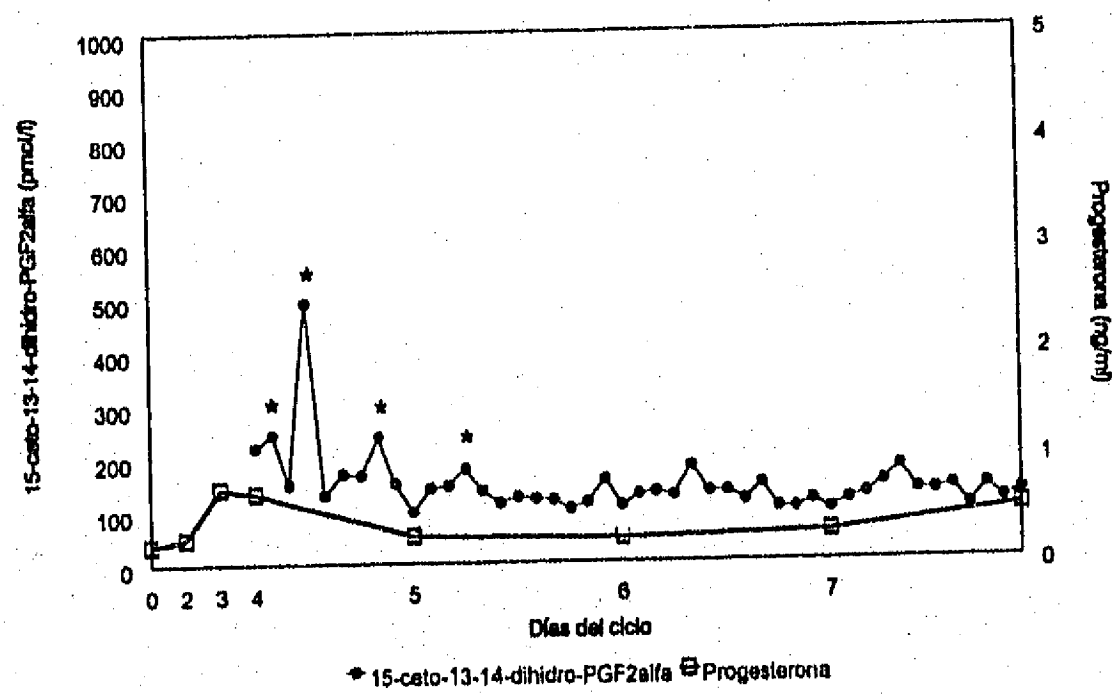


Figura 10. Oveja 100

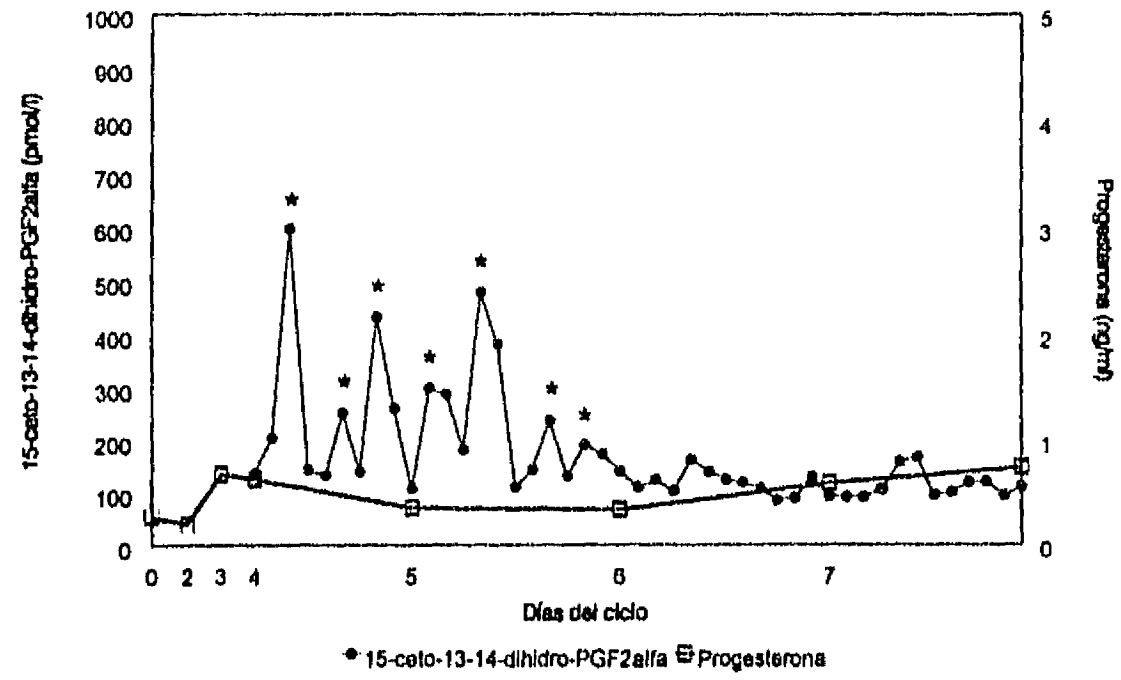


Figura 11. Oveja 101

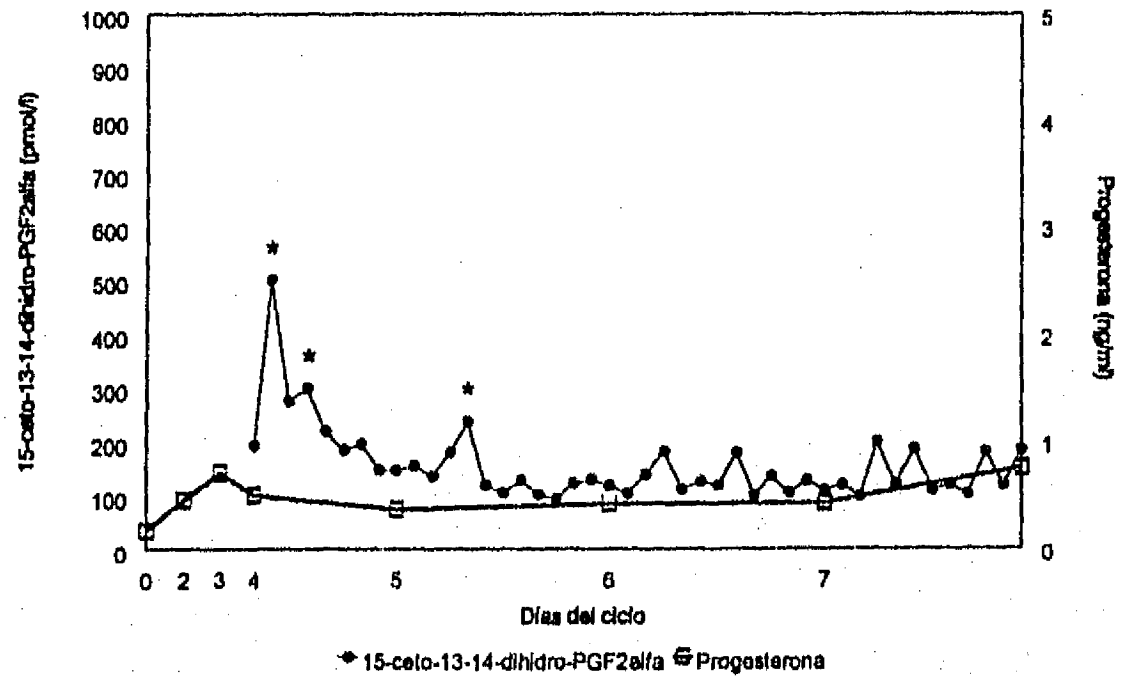


Figura 12. Oveja 106

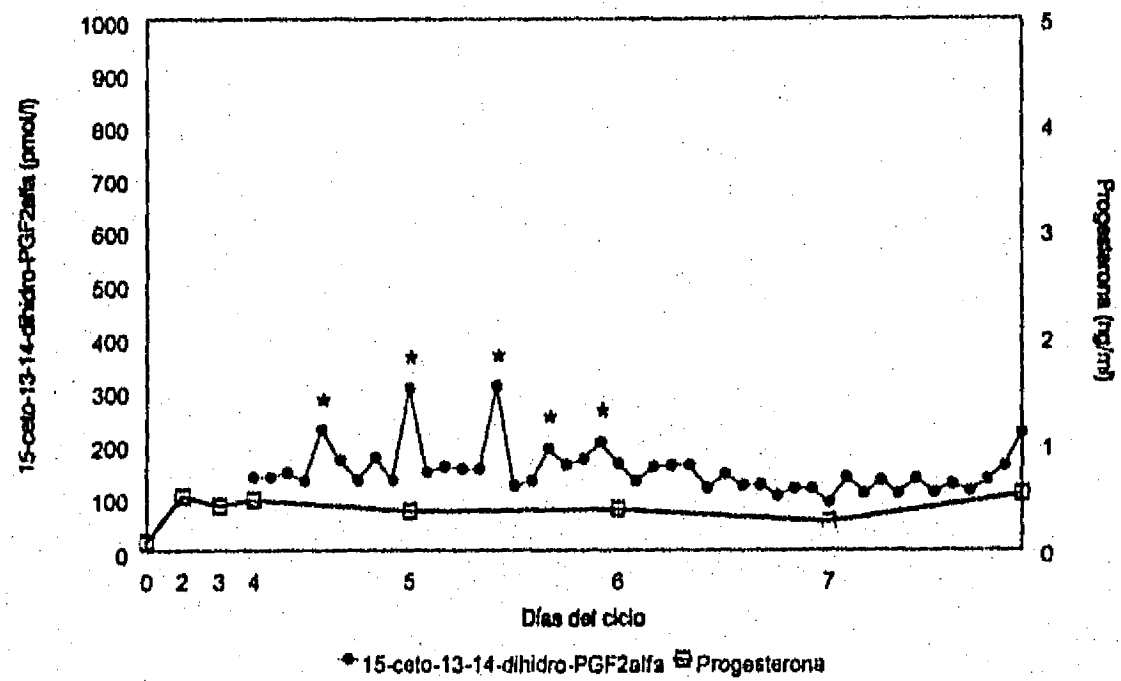
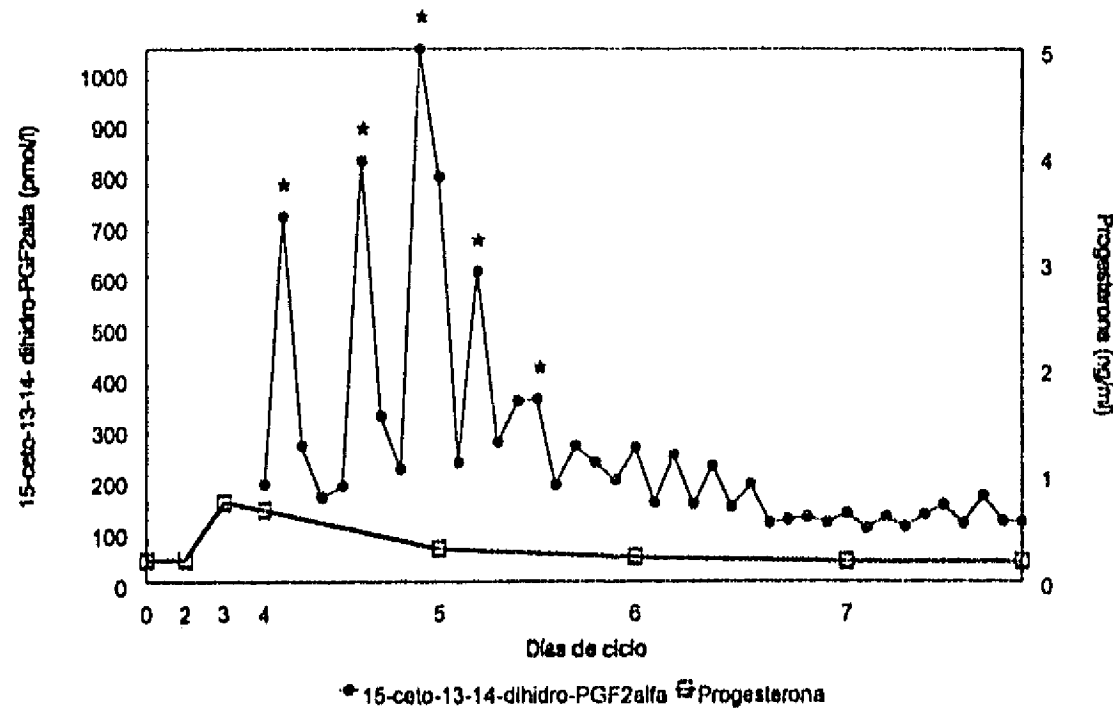


Figura 13. Oveja 116



Figuras 7 a 13. Concentraciones de progesterona y 15-ceto-13-14-dihidro-PGF2 $\alpha$  de ovejas en anestro estacional inducidas a ovular con hCG, no tratadas con LFE. Los valores señalados con asteriscos indican la presentación del pulsos significativos del metabolito de la PGF2 $\alpha$ .

### Discusión

La administración de LFE resultó en una supresión significativa de las concentraciones de FSH similar a la que ocurre cuando se administra LFB (McNeilly, 1984). Esta observación demuestra que el LFE es una fuente rica en inhibina susceptible de ser utilizada en la oveja, y confirma lo señalado por Knight (1991) acerca de la alta homología de la inhibina en las diferentes especies domésticas.

En el presente trabajo, las ovejas que fueron inducidas a ovular con hCG durante la época de anestro sufrieron regresión prematura del cuerpo lúteo, tal como ha sido descrito previamente (Beard y Hunter 1994; Balcázar 1995). La secreción de la PGF2 $\alpha$  en las ovejas que tuvieron fases lúteas cortas tuvo un patrón pulsátil con intervalos entre pulsos de  $8.0 \pm 0.9$  h, similar al que ocurre durante la luteólisis normal en ovejas cíclicas (Zarco *et al.*, 1984, 1988a). Estos resultados coinciden con lo encontrado por Hunter *et al.* (1989) y confirman que la regresión prematura obedece a la liberación anticipada de PGF2 $\alpha$ .

El tratamiento con LFE evitó la regresión prematura del cuerpo lúteo, lo que coincide con lo encontrado por Balcázar (1995) y por Zárate (1996), quienes también administraron LFE.

Además, los resultados son comparables a lo observado por Beard y Hunter (1994), quienes utilizaron LFB. La administración de LFE no suprimió la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  pero sí modificó su patrón de secreción. El número de pulsos fue similar en los dos grupos, sin embargo fue evidente un cambio en la frecuencia, de tal forma que las ovejas tratadas tuvieron un intervalo entre pulsos de  $16.2 \pm 1.2$  h, mientras que en los animales del grupo testigo el intervalo fue de  $8.0 \pm 0.9$  h. Posiblemente el cambio en la frecuencia de los pulsos evitó la regresión del cuerpo lúteo, ya que el patrón de secreción de la  $\text{PGF2}\alpha$  está asociado con la regresión del cuerpo lúteo; Zarco *et al.* (1988a) encontraron que para que ocurra la luteólisis en ovejas ciclando se necesitan 6 pulsos secretados a intervalos de 8 h, y señalan que una modificación de este patrón previene la regresión lútea. Los mismos autores encontraron que en ovejas con persistencia espontánea del cuerpo lúteo la  $\text{PGF2}\alpha$  se libera en forma pulsátil, pero los pulsos ocurren con un intervalo de 16 h, lo que evita que la luteólisis se lleve a cabo (Zarco *et al.*, 1984). Llama la atención que el intervalo entre pulsos asociado con la persistencia espontánea de cuerpo lúteo en ovejas es similar al provocado en el presente trabajo mediante la supresión del desarrollo folicular. Esto podría sugerir que la persistencia espontánea del cuerpo lúteo descrita por Zarco *et al.* (1984) podría ser provocada por deficiencias en el desarrollo y/o función folicular.

Zhang *et al.* (1991) suprimieron la secreción de estradiol mediante la destrucción de los folículos ováricos poco antes del momento esperado de la luteólisis en ciclos estrales normales, encontrando que se alargó el intervalo entre pulsos de  $\text{PGF2}\alpha$  y consecuentemente se retrasó la regresión lútea; asimismo, mencionan que las ovejas a las cuales se les eliminaron los folículos y recibieron un implante de estradiol volvieron a secretar  $\text{PGF2}\alpha$  en un patrón luteolítico. Esto es similar a lo observado en este trabajo, donde se suprimió la secreción de FSH mediante el tratamiento con LFE, lo que provocó que se alargara el intervalo entre pulsos de  $\text{PGF2}\alpha$ . Aunque en este estudio no se midió el grado de inhibición del desarrollo folicular ni las concentraciones de estradiol, en un estudio previo se demostró que el



tratamiento con LFE suprime el desarrollo folicular y reduce la concentración de estradiol a nivel folicular (Capítulo IV del presente trabajo).

Si bien la evidencia indica que el LFE evita la regresión prematura del cuerpo lúteo mediante la modificación de la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$ , no se debe descartar el efecto directo que tiene el LFE sobre la función lútea, ya que se ha observado que ovejas tratadas con LFE durante la fase lútea de un ciclo normal producen más progesterona que las ovejas testigo, de tal forma que el efecto antiluteolítico del LFE pudiera estar asociado con un efecto luteotrópico (Mejía, 1995). Sin embargo, Beard y Hunter (1994) también evitaron la regresión lútea prematura mediante el tratamiento con LFB a pesar de que el LFB, no tiene efecto directo sobre la función del cuerpo lúteo (Larson *et al.*, 1991).

Por otra parte, se desconoce si la inhibina es la única sustancia presente en el LFE capaz de suprimir el desarrollo folicular, en el caso del LFB existe evidencia de que aún después de retirarle la fracción de inhibina retiene su capacidad inhibitoria sobre desarrollo folicular y la producción de estradiol (Baxter *et al.*, 1995).

Se concluye que la regresión prematura de los cuerpos lúteos de ovejas inducidas a ovular durante la época de anestro estacional está asociada con la secreción pulsátil de  $\text{PGF2}\alpha$ , y el tratamiento con líquido folicular equino libre de esteroides altera la frecuencia de secreción de la  $\text{PGF2}\alpha$ , lo que evita la regresión del cuerpo lúteo.

## CAPITULO VI

### DISCUSION GENERAL

Diversos estudios en los que se ha administrado líquido folicular equino libre de esteroides a yeguas han demostrado que dicho líquido tiene actividad de inhibina, ya que suprime la secreción de FSH (Miller *et al.*, 1979a; Bergfelt y Ginther, 1985; Roser *et al.*, 1994). Esto, aunado a la poca disponibilidad de líquido folicular bovino, que ha sido tradicionalmente utilizado como fuente de inhibina para estudios en ovejas, sugirió la posibilidad de utilizar el líquido folicular equino como fuente de inhibina en investigación con ovinos. Sin embargo, nunca se había evaluado si la actividad de la inhibina del LFE se manifestaba en la oveja.

Los resultados de los experimentos realizados en el presente trabajo demostraron que la actividad de inhibina del LFE se manifiesta plenamente en la oveja, ya que logró suprimir las concentraciones de FSH en ovejas en anestro estacional inducidas a ovular con hCG, y durante el diestro tardío de ovejas cíclicas. Los resultados obtenidos por nosotros con LFE son similares a los obtenidos cuando se ha administrado LFB a ovejas en anestro estacional (Hunter *et al.*, 1988a; McLeod y McNeilly, 1987), en el proestro (McNeilly, 1984, 1985) o durante el diestro (Larson *et al.*, 1991), en las cuales también se suprimen las concentraciones de FSH. Los resultados confirman lo señalado por Knight, (1991) acerca de la alta homología que existe entre la inhibina de las diferentes especies domésticas, lo que permite utilizar líquido folicular de diversas especies como fuente de inhibina.

Las ovejas tratadas con LFE durante el diestro tuvieron un intervalo de la aplicación de PGF2 $\alpha$  a la presentación del estro más largo que las ovejas no tratadas con LFE. Este efecto es similar al observado en yeguas tratadas con LFE (Bergfelt y Ginther, 1985), y al encontrado en ovejas que recibieron LFB (McNeilly, 1984, 1985). En diversos estudios se ha demostrado que el retraso en la presentación del estro provocado por la administración de líquido folicular obedece a una supresión del desarrollo folicular y a una inhibición de la producción de estradiol (Miller *et al.*, 1979b; Wallace y McNeilly, 1986; McLeod y McNeilly, 1987; Hunter *et al.*, 1988a).

En el presente trabajo se demostró que este también es el caso cuando se administra LFE a ovejas, ya que tanto el diámetro folicular como la concentración de estradiol en el líquido del folículo fueron significativamente menores en el día 14 del diestro cuando las ovejas fueron previamente tratadas durante 3 días con LFE.

En este trabajo el efecto inhibitorio del tratamiento con LFE sobre el desarrollo folicular y la producción de estradiol está asociado con la supresión de las concentraciones de FSH, por lo que el efecto de inhibina es evidente. Sin embargo, los resultados no permiten asegurar que el efecto del LFE se haya debido únicamente a la supresión de las concentraciones de FSH como consecuencia de su contenido de inhibina, ya que se administró la fracción proteica del líquido folicular equino, la cual contiene otros componentes que pueden regular el desarrollo folicular localmente. A este respecto, Campbell *et al.*, (1991c) administraron a ovejas líquido folicular ovino libre de esteroides y de inhibina, y observaron que este líquido continuaba inhibiendo el desarrollo folicular y la producción de estradiol. Por otra parte, Law *et al.*, (1992) encontraron que el efecto del LFB sobre el retraso en la presentación del estro en vaquillas tratadas con PGF2 $\alpha$  no es dependiente del contenido de inhibina, ya que los animales tratados con LFB, al cual previamente se le había retirado la fracción de inhibina, presentaron un retraso significativo del estro.

En el presente estudio se logró demostrar la hipótesis de que la inhibición del desarrollo folicular provocada por la administración de LFE resultaría en un retraso de la luteólisis tanto durante el diestro normal como durante el diestro subsecuente a la inducción de ovulación durante la época de anestro, lo que normalmente resulta en luteólisis prematura. En el primer caso, la supresión del desarrollo folicular provocada por el LFE durante el diestro tardío permitió retrasar la regresión del cuerpo lúteo, confirmando lo observado Miquelajauregui (1993) quien utilizó LFB. Esta inhibición de la luteólisis provocada por una inhibición hormonal del desarrollo folicular coincide con lo observado cuando se eliminan físicamente los folículos en la oveja (Karsch *et al.*, 1970; Ginther, 1971), y en la vaca (Villa-Godoy *et al.*, 1985). Sin embargo, tanto en el caso de Miquelajauregui (1993) como en este estudio el alargamiento de

la fase lútea fue menor al logrado cuando los folículos se eliminan completamente por métodos físicos. Esta diferencia posiblemente está asociado al grado en que se suprime la fuente de estradiol. En los casos en los cuales se electrocauterizan los folículos se destruyen todos los folículos visibles, mientras que en las ovejas tratadas con LFB o LFE se reduce su crecimiento y la producción de estradiol, pero los folículos no desaparecen. Así, en las ovejas tratadas es posible que las concentraciones de estradiol, aunque bajas, eventualmente fueron suficientes para el establecimiento de una secreción pulsátil con características luteolíticas (Zhang *et al.* 1991).

En las ovejas a las cuales se les determinaron las concentraciones del metabolito de la  $PGF2\alpha$  durante el diestro tardío se observó un patrón pulsátil a partir del día 14, sin embargo solo en las ovejas testigo se estableció una frecuencia de pulsos de características luteolíticas (1 pulso cada  $8 \pm 1.06$  h) en los días 15 y 16 del ciclo, mientras que en las ovejas tratadas con LFE la frecuencia de pulsos en ese mismo periodo fue muy baja, detectándose un pulso cada  $14.6 \pm 1.08$  h, el cual no ocasionó la luteólisis. Esta baja frecuencia es similar a la encontrada por Zarco *et al.*, (1984) en ovejas que tuvieron persistencia espontánea de cuerpo lúteo, las cuales presentaron un patrón pulsátil de secreción de  $PGF2\alpha$ , sin embargo el intervalo entre pulsos fue de 16 h, lo que fue insuficiente para provocar la regresión del cuerpo lúteo a pesar de que la cantidad total de  $PGF2\alpha$  secretada fue similar en ovejas normales y en aquellas con persistencia espontánea del cuerpo lúteo. Zarco *et al.* (1984) postularon que una modificación en el patrón de secreción de  $PGF2\alpha$  podría ser suficiente para impedir la luteólisis, lo cual confirmaron posteriormente al demostrar que durante el reconocimiento materno de la gestación la oveja gestante produce cantidades de  $PGF2\alpha$  similares a las de las ovejas que están sufriendo regresión del cuerpo lúteo, sin embargo, la supresión de un patrón pulsátil de secreción o el alargamiento del intervalo entre pulsos evita la regresión del cuerpo lúteo en el animal gestante (Zarco *et al.*, 1988b).

La modificación en la frecuencia de los pulsos de  $PGF2\alpha$  también fue observada en las ovejas que se indujeron a ovular en la época de anestro y que fueron tratadas con LFE. En

estas hembras se encontró que el tratamiento no suprimió la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  sino sólo modificó su patrón de secreción, alargando el intervalo entre los pulsos. Las ovejas tratadas con LFE tuvieron un intervalo de  $16.2 \pm 1.2$  h mientras que en las testigo fue de  $8 \pm 0.9$  h. Este alargamiento del intervalo entre pulsos de  $\text{PGF2}\alpha$  fue suficiente para evitar la regresión prematura del cuerpo lúteo.

En las ovejas en anestro a las cuales se les alargó la fase lútea mediante el tratamiento con LFE la regresión del cuerpo lúteo ocurrió después de 10 a 12 días de exposición a progesterona aún cuando todavía se encontraban recibiendo LFE, asimismo fue evidente que en el día 14 o 15 del ciclo tanto las ovejas cíclicas tratadas con LFE como las testigo comenzaron a liberar pulsos de  $\text{PGF2}\alpha$ . Es posible que a pesar de la supresión de la concentración de estradiol lograda con el tratamiento con LFE, la duración de la exposición a progesterona determinó finalmente el inicio de la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$ . Estos resultados son similares a lo encontrado por Zhang *et al.*, (1991) quienes eliminaron los folículos ováricos antes de la luteólisis esperada y observaron que no se suprimió la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  ya que comenzó a secretarse al mismo tiempo en los animales intactos que en aquellos en los cuales se eliminaron los folículos, sin embargo, en estos últimos no se estableció la frecuencia necesaria para provocar luteólisis. Lo anterior permite pensar que después de 10 a 12 días de exposición a progesterona el endometrio puede comenzar a secretar  $\text{PGF2}\alpha$  en ausencia de estradiol, y que esta hormona es más importante para el establecimiento del patrón de secreción pulsátil con características luteolíticas, que para que de inicio la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$ .

Beard y Hunter (1994) previamente sugirieron que la ausencia de estradiol provocada por la administración de LFB ocasionaba una supresión funcional de los receptores para oxitocina en el útero. Los resultados del presente experimento sugieren que la falta de estradiol provoca un retraso en el reciclaje de receptores para oxitocina, más que su inactivación total.

El tratamiento con LFE en ovejas en anestro estacional que se indujeron a ovular inhibió la regresión prematura del cuerpo lúteo lo que confirma lo señalado por Hunter *et al.*, (1989)

quienes mencionan que los cuerpos lúteos de vida corta son intrínsecamente normales y que la regresión prematura obedece a un adelanto en la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$ . En este trabajo fue evidente que cuando se inhibe la luteólisis prematura estos cuerpos lúteos se desarrollan normalmente, secretan progesterona en concentraciones normales, y regresan en el momento en que lo hacen las ovejas que están ciclando. Esto permite especular acerca de las posibilidades de la utilización de las ovulaciones inducidas con una sola inyección de hCG en la época de anestro para gestar a estos animales, ya que, sí es posible provocar una fase lútea de duración normal administrando LFE, tal vez se pueda fertilizar al ovocito y establecer una gestación.

Los experimentos realizados establecen que el tratamiento con el LFE suprimió la secreción de FSH, inhibió el desarrollo folicular y redujo la producción de estradiol. Esta deficiente secreción de estradiol resultó en la modificación del patrón de secreción pulsátil de  $\text{PGF2}\alpha$ , ya que el intervalo entre pulsos aumentó hasta el punto de ser incapaz de provocar la luteólisis. Debido a estos efectos la administración de LFE provocó un alargamiento de la fase lútea normal y evitó la regresión prematura del cuerpo lúteo de ovejas en anestro estacional inducidas a ovular con hCG.

## CAPITULO VII

### LITERATURA CITADA

Aiumlamai, S., Odensvik, K., Stabenfeldt, G. and Kindahl, H. Regulation of prostaglandin biosynthesis with flunixin meglumine in the bovine species. *J. Vet. Med. A.*, 37:16-22 (1990).

Alecozay, A.A., Selcer, K.W., Clark, J.R., Burns, J.M., Norman, R.L., Niswender, G.D. and Leavitt, W.W.: Pattern of ovarian progesterone secretion during the luteal phase of the ovine estrous cycle. *Biol. Reprod.*, 39:287-294 (1988).

Alila, H.W, and Dowd, J.P.: The control of corpus luteum function in domestic ruminants. *Oxford Reviews of Reproductive Biology.* 13:203-237 (1991).

Al-Obaidi, S.A.R., Bindon, B.M., Findlay, J.K., Hillard, M.A. and O'Shea, T.: Plasma follicle stimulating hormone in Merino ewes immunized with an inhibin-enriched fraction from bovine fluid. *Anim. Reprod. Sci.* 14:39-51 (1987).

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).

Baird, D.T.: Lutetrophic control of the corpus luteum. *Anim. Reprod. Sci.* 28:95-110 (1992).

Balcázar, S.A.: Efecto de administración de líquido folicular equino libre de esteroides 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 Med. Vet. Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1995).

Battye, K.M., Fairclough, R.J., Cameron, A.W.N. and Trounson, A.O.: Evidence for prostaglandin involvement in early luteal regression of the superovulated nanny goat (*Capra hircus*). *J. Reprod. Fert.*, 84:425-430 (1988).

Baxter, G., O'Shea, T., Campbell, B. and Webb, R.: Effects of bovine follicular fluid (bFF) fractions, which delay oestrus in sheep and cattle, on proliferation and steroid production by cultured granulosa cells. *J. Reprod. Fert., 15 Abstract Series:*64 (1995).

Bazer, F.W., Thatcher, W.W., Hansen, M.A., Mirando, M.A., Ott, T.L. and Plante, C.: Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants. *J. Reprod. Fert. suppl.* 43:39-47 (1991).

Beard, A.J., Castillo, R.J., McLeod, B.J., Glencross, R.G. and Knight, P.G.: Comparison of the effects of crude or highly-purified bovine inhibin (M 32 000) on plasma concentrations of FSH and LH in chronically ovariectomized prepubertal heifers. *J. Endocr.* 125:21-30 (1990).

Beard, A.P. and Hunter, M.G.: Effects of bovine follicular fluid and exogenous oestradiol on the GnRH-induced short luteal phase in anoestrous ewes. *J. Reprod. Fert.*, 100:211-217 (1994).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Beard, A.P. and Lamming, G.E.: Oestradiol concentration and the development of the uterine oxytocin receptor and oxytocin-induced PGF<sub>2</sub> $\alpha$  release in ewes. *J. Reprod. Fert.*, 100:469-475 (1994).

Beard, A.P., Bartlewski, P.M. and Rawlings, N.C.: Ovarian follicular development during early pregnancy in the ewe. *J. Reprod. Fert. Abstract Series* 15:65 (1995).

Beck, N.F.G., Jones, M., Davies, B., Mann, G.E. and Peters, A.R.: The effect of GnRH analogue (buserelin) treatment on day 12 post mating on ovarian function in ewes. *J. Reprod. Fert. Abstract Series* 15:73 (1995).

Bergfelt, D.R. and Ginther, O.J.: Delayed follicular development and ovulation following inhibition of FSH with equine fluid in the mare. *Theriogenology*, 24:99-109 (1985).

Bettencourt, C.M.V., Moffatt, R.J. and Keisler, D.H.: Active immunization of ewes against prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  to control ovarian function. *J. Reprod. Fert.*, 97:123-131 (1993).

Bygdeman, M.: Effects of prostaglandins on the genital tract. *Acta vet. scand. Suppl.*, 77:47-54 (1981).

Braden, T.D., Sawyer, H.R. and Niswender, G.D.: Functional and morphological characteristics of the first corpus luteum formed after parturition in ewes. *J. Reprod. Fert.*, 86:525-533 (1989a).

Braden, T.D., King, M.E., Odde, K.G. and Niswender, G.D.: Development of preovulatory follicles expected to form short-lived corpora lutea in beef cows. *J. Reprod. Fert.*, 85:97-104 (1989b).

Breuel, K.F., Lewis, P.E., Schrick, F.N., Lishman, A.W., Inskoop, E.K. and Butcher, R.L.: Factors affecting fertility in the postpartum cow: role of the oocyte and follicle in conception rate. *Biol. Reprod.*, 48:645-661 (1993).

Brinsfield, T.H. and Hawk, H.W.: Control by progesterone of the concentration of lipid droplets in epithelial cells of the sheep endometrium. *J. Anim. Sci.*, 36:919-922 (1973).

Cahill, L.P. and Mauléon, P.: A study of the population of primordial and small follicles in the sheep. *J. Reprod. Fert.* 61:201-206 (1981).

Campbell, B.K., McNeilly, A.S., Picton, H.M. and Baird D.T.: The effect of a potent GnRH antagonist on ovarian secretion of oestradiol, inhibin and androstenedione and the concentration of LH and FSH during the follicular phase of the sheep oestrus cycle. *J. Endocr.* 126:377-384 (1990).

Campbell, B.K., Scaramuzzi, R.J., Evans, G. and Downing J.A.: Increased ovulation rate in androstenedione-immune ewes is not due to elevated plasma concentrations of FSH. *J. Reprod. Fert.* 91:655-666 (1991a).

Campbell, B.K., McNeilly, A.S., Mann, G.E. and Baird, D.T.: Effect of stage of oestrous cycle and follicular maturation on ovarian inhibin production in sheep. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 43:172-173 (1991b).



- Campbell, B.K., Picton, H.M., Mann, G.M., McNeilly, A.S. and Baird, D.T.: The effect of steroid and inhibin-free ovine follicular fluid on ovarian follicle population and ovarian hormone secretion. *J. Reprod. Fert.* 93:81-96 (1991c).
- Campbell, B.K. and Webb, R.: Evidence that inhibin has autocrine and paracrine actions in controlling ovarian function in sheep. *J. Reprod. Fert. Abstract Series* 15:48 (1995).
- Campbell, B.K., Scaramuzzi, R.J. and Webb, R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J. Reprod. Fert. Suppl* 49:335-350 (1995).
- Chemineau, P.: Plasma levels of LH, FSH, prolactin, oestradiol 17  $\beta$  and P4 during natural and induced oestrus in the dairy goat. *Theriogenology*, 17:313-322 (1982).
- 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).
- Cummins, L.J., O'Shea, T., Al-Obaidi, S.A.R., Bindon, B.M. and Findlay, J.K.: Increase in ovulation rate after immunization of Merino ewes with a fraction of bovine follicular fluid containing inhibin activity. *J. Reprod. Fert.* 77:365-372 (1986).
- Diekman, M.A., O'Callaghan, P., Nett, T.M. and Niswender, G.D.: Validation of methods and quantification of luteal receptors for LH throughout the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol. Reprod.*, 19:999-1009 (1978).
- Driancourt, M.A. and Fry, R.C.: Differentiation of ovulatory follicles in sheep. *J. Anim. Sci.* 66 Suppl. 2:9-20 (1988).
- 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).
- Driancourt, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology* 35:55-79 (1991).
- Einspainer, R., Miyamoto, A., Schams, D., Müller, M. and Brem, G.: Tissue concentration, mRNA expression and stimulation of IGF-I in luteal tissue during the oestrous cycle and pregnancy of cows. *J. Reprod. Fert.*, 90:439-445 (1990).
- Fairclough, R.J., Moore, L.G., Peterson, A.J. and Watkins, W.B.: Effect of oxytocin on plasma concentration of 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin F and the oxytocin-associated neurophysin during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol. Reprod.*, 31 :36-43 (1984).
- Farin, C.E., Moeller, C.L., Sawyer, H.R., Gamboni, F. and Niswender, G.D.: Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biol. Reprod.*, 35:1299-1308 (1986).
- Farin, C.E. Moeller, C.L., Mayan, H., Gamboni, F., Sawyer, H.R. and Niswender, G.D.: Effect of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on cell populations in the ovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 38:413-421 (1988).

Farin, C.E., Nett, T.M. and Niswender, G.D.: Effects of luteinizing hormone on luteal cell populations in hypophysectomized ewes. *J. Reprod. Fert.*, 88:61-70 (1990).

Findlay, J.K., Robertson, D.M. and Clarke, I.J.: Influence of dose and route of administration of bovine follicular fluid and suppressive effect of purified inhibin (M, 31 000) on plasma FSH concentrations in ovariectomized ewes. *J. Reprod. Fert.* 80:455-461 (1987).

Findlay, J.K., Clarke, I.J. and Robertson, D.M.: Inhibin concentration in ovarian and jugular venous plasma and relationship of inhibin with follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during the ovine estrous cycle. *J. Endocr.* 126:528-535 (1990).

Findlay, J.K., Robertson, D.M., Clarke, I.J., Klein, R., Doughton, B.W., Xiao, S., Russell, D.L. and Shukovski, L. Hormonal regulation of reproduction-general concepts. *Anim. Reprod. Sci.* 28:319-328 (1992).

Findlay, J.K.: An update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol. Reprod.* 48:15-23 (1993).

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).

Fitz, T.A., Mock, E.J., Mayan, M.H. and Niswender, G.D.: Interactions of prostaglandins with subpopulations of ovine luteal cells. II. Inhibitory effects of PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and protection by PGE<sub>2</sub>. *Prostaglandins* 28:127 (1984).

Flint, A.P.F., Sheldrick, E.L., McCann, T.J. and Jones, D.S.C.: Luteal oxytocin: Characteristics and control of synchronous episodes of oxytocin and PGF<sub>2</sub> $\alpha$  secretion at luteolysis in ruminants. *Domes. Anim. Endocr.*, 7:111-124 (1990).

Fortune, J.E.: Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.* 50:225-232 (1994).

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

García, de M.E.: Apuntes de climatología. 3a Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1980.

Garcia-Winder, M., Lewis, P.E., Deaver, D.R., Smith, V.G., Lewis, G.S. and Inskeep, E.K.: Endocrine profiles associated with life span of induced corpora lutea in postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.*, 62:1353-1362 (1986).

Garverick, H.A., Parfet, J.R., Lee, C.N., Copelin, J.P., Youngquist, R.S. and Smith, M.F.: Relationship of pre- and post-ovulatory gonadotropin concentrations to subnormal luteal function in postpartum beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 66:104-111 (1988).

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).

Ginther, O.J.: Response of corpora lutea to cauterization of follicles in sheep. *Am. J. Vet. Res.*, 32:59-62 (1971).

Ginther, O.J.: Local versus systemic uteroovarian relationships in farm animals. *Acta vet. scand. Suppl.*, 77:103-115 (1981).

Ginther, O.J.: Folliculogenesis during the transitional period and early ovulation season in mares. *J. Reprod. Fert.*, 90:311-320 (1990).

Ginther, O.J., Kot, K. and Wiltbank, M.C.: Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 43:689-703 (1995).

Granström, E.: Prostaglandin chemistry. *Acta vet. scand. Suppl.*, 77:1-4 (1981).

Granström, E. and Kindahl, H.: Radioimmunoassay of the major plasma metabolite of PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , 15-keto-13,14-dihydro-PGF<sub>2</sub> $\alpha$ . *Methods Enzymol*, 86:320-329 (1982).

Gremmes, S.: The secretional profile of gonadotrophins in the mare following hormonal intervention. Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover. Hannover, Germany (1990).

Grummer, R.R. and Carroll, D.J.: A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. *J. Anim. Sci.*, 66:3160-3173 (1988).

Hanrahan, J.P. and Quirke, J.F.: Repeatability of the duration of oestrus and breed differences in the relationship between duration of oestrus and ovulation rate of sheep. *J. Reprod. Fert.*, 45:29-36 (1975).

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

Harrison, L.M., Kenny, N. and Niswender, G.D.: Progesterone production, LH-receptors, and oxytocin secretion by ovine luteal cell types on days 6, 10 and 15 of the oestrous cycle and day 25 of pregnancy. *J. Reprod. Fert.*, 79:539-548 (1987).

Henderson, K.M., Franchimont, P., Lecomte-Yerna, M.J. and Hudson, N.: Increase in ovulation rate after active immunization of sheep with inhibin partially purified from bovine follicular fluid. *J. Endocr.* 102:305-309 (1984).

Henricks, D.M.: Biochemistry and physiology of the gonadal hormones. In *Reproduction in Domestic Animals*. 4th Ed. Ed. Cupps, P.T. Academic Press. San Diego California, USA:81-118 (1991).

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

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. Fert.*, 76:349-363 (1986).

Hunter, M.G., Hindle, J.E., McLeod, B.J. and McNeilly, A.S.: Treatment with bovine follicular fluid suppresses follicular development in gonadotrophin-releasing hormone-treated anoestrous ewes. *J. Endocr.* 119:95-100 (1988a).

Hunter, M.G., Southee, J.A. and Lamming, G.E.: Function of anormal corpora lutea *in vitro* after GnRH-induced ovulation in the anoestrous ewe. *J. Reprod. Fert.*, 84:139-148 (1988).

Hunter, M.G., Ayad, V.J., Gilbert, C.L., Southee, J.A. and Wathes, D.C.: Role of prostaglandin F-2<sub>α</sub> and oxytocin in the regression of GnRH-induced abnormal corpora lutea in anoestrous ewes. *J. Reprod. Fert.*, 85:551-561 (1989).

Hunter, M.G.: Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. *J. Reprod. Fert. suppl.* 43:77-89 (1991).

Inskeep, E.K., Braden, T.D., Lewis, P.E., Garcia-Winder, M. and Niswender, G.D.: Receptors for luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in largest follicles of postpartum beef cows. *Biol. Reprod.*, 38:587-591 (1988).

Ireland, J.J. and Roche, F.: Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology*, 112:150-156 (1983).

Jacobs, A.L., Edgerton, L.A., Silvia, W.J. and Schillo, K.K.: Effect of an estrogen antagonist (tamoxifen) on cloprostenol-induced luteolysis in heifers. *J. Anim. Sci.*, 66:735-742 (1988).

Karsch, F.J., Noveroske, J.W., Roche, J.F., Norton, H.W. and Nalvandov, A.V.: Maintenance of ovine corpora lutea in the absence of ovarian follicles. *Endocrinology*, 87:1228-1230 (1970).

Karsch, F.J., Roche, J.F., Noveroske, J.W., Foster, D.L., Norton, H.W. and Nalvandov, A.V.: Prolonged maintenance of the corpus luteum of the ewe by continuous infusion of luteinizing hormone. *Biol. Reprod.*, 4:129-136 (1971).

Karsch, F.J., Cummins, J.T., Thomas, G.B. and Clarke, I.J.: Steroid feedback inhibition of pulsatile secretion of gonadotrophin-releasing hormone in the ewe. *Biol. Reprod.*, 36:1207-1218 (1987).

Karsch, F.J., Moenter, S.M. and Caraty, A.: The neuroendocrine signal for ovulation. *Anim. Reprod. Sci.*, 28:329-341 (1992).

Keisler, D.H., Inskeep, E.K. and Dailey.: First luteal tissue in ewe lambs: Influence on subsequent ovarian activity and response to hysterectomy. *J. Anim. Sci.*, 57:150-156 (1983).

- Kindahl, H.: Assay methods for prostaglandins. *Acta vet. scand. Suppl.*, 77:29-37 (1981).
- Kindahl, H.: Maternal recognition of pregnancy in ruminants: an "on-of-mechanism" of prostaglandin release. Proceedings of XIV Pan American Congress on Veterinary Sciences. Acapulco México. 586-589 (1994).
- Knight, P.G., Castillo, R.J. and Glencross, R.G.: Isolation from bovine follicular fluid (bFF) of a 32 kDalton molecule with potent inhibin-like biological activity (ILA). *J. Endocr.* 112 Suppl. Abstr. 52: (1987).
- Knight, P.G. and Castillo, R.J.: Effects of bovine follicular fluid on gonadotrophin secretion in intact and chronically ovariectomized ewes before and after desensitization of pituitary gonadotrophs to gonadotrophin-releasing hormone. *J. Endocr.* 117:431-439 (1988).
- Knight, P.G.: Identification and purification of inhibin and inhibin-related proteins. *J. Reprod. Fert.* 43:111-123 (1991).
- Lamming, G.E., Vallet, J.L. and Flint, A.P.: Progesterone control of endometrial oxytocin receptor determines cycle length in sheep. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 43:53-54 (1991).
- Lamming, G.E. and Mann, G.E.: A dual role for progesterone in the control of cyclicity in ruminants. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 49:561-566 (1995).
- Larson, G.H., 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).
- Law, A.S., Baxter, G., Logue, D.N., O'Shea, T. and Webb, R.: Evidence for the action of bovine follicular fluid factor(s) other than inhibin in suppressing follicular development and delaying oestrus in heifers. *J. Reprod. Fert.* 96:603-616 (1992).
- Leaver, H.A. and Poyser, N.L.: Distribution of arachidonic acid and other fatty acids in the lipids of guinea-pig uterus and plasma in relation to uterine prostaglandin synthesis. *J. Reprod. Fert.*, 61:325-333 (1981).
- Legan, S.J., l'Anson, H., Fitzgerald, B.P. and Akaydin, M.S.: Importance of short luteal phases in the endocrine mechanism controlling initiation of estrous cycles in anestrus ewes. *Endocrinology*, 112:1530-1536 (1985).
- Legan, S.J., l'Anson, H. and Neiser, P.: Progesterone ensures full-length luteal phases during the breeding season in ewes. *J. Endocr.*, 129:371-379 (1991).
- Leversha, L.J., Robertson, D.M., de Vos, F.L., Morgan, F.J., Hearn, M.T.W., Wettenhall, R.E.H., Findlay, J.K., Burger, H.G. and de Kretser, D.M.: Isolation of inhibin from ovine follicular fluid. *J. Endocr.* 113:213-221 (1987).
- Lobb, D.K. and Dorrington, J.: Intraovarian regulation of follicular development. *Anim. Reprod. Sci.* 28:343-354 (1992).
- Luck, M.R.: A function of ovarian oxytocin. *J. Endocr.*, 121:203 (1989).

Lucy, M.C., Collier, R.J., Kitchell, M.L., Dibner, J.J., Hauser, S.D. and Krivi, G.G.: Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. *Biol. Reprod.*, 48:1219-1227 (1993).

Lucy, M.C., Curran, T.L., Collier, R.J. and Cole, W.J.: Extended function of the corpus luteum and earlier development of the second follicular wave in heifers treated with bovine somatotropin. *Theriogenology*, 41:561-572 (1994).

Macmillan, K.L. and Thatcher, W.W.: Effects of an agonist of gonadotrophin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol. Reprod.*, 45:883-889 (1991).

Malpaux, B., Robinson, J.E., Wayne, N.L. and Karsch, F.J.: Regulation of onset of the breeding season of the ewe: importance of long days and of an endogenous reproductive rhythm. *J. Endocr.*, 122:269-278 (1989).

McCracken, J.A., Schramm, W., Barcikowski, B. and Wilson, L.: The identification of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  as a uterine luteolytic hormone and the hormonal control of its synthesis. *Acta vet. scand. Suppl.*, 77:71-88 (1981).

McCracken, J.A., Schramm, W. and Okulicz, W.C.: Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF<sub>2</sub> $\alpha$  from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.*, 7:31-55 (1984).

McCracken, J.A., Smith, T.T., Lamsa, J.C. and Robinson, A.G.: The effect of estradiol-17 $\beta$  and progesterone on the oxytocin pulse generator in the ovexed sheep. *Biol. Reprod.*, 44 Suppl. 1:87 (1991).

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).

Mariana, J.C., Donniaux, D., Driancourt, M.A. and Mauleon, P.: Folliculogenesis. In *Reproduction in Domestic Animals*. 4 Ed. Ed. Cupps, P.T. Academic Press, Inc. San Diego, California. USA. 1992.

McLeod, B. J., Haresing, W. and Lamming, G.E.: Induction of ovulation and luteal function in seasonally anoestrus ewes treated with small-dose multiple injection of GnRH. *J. Reprod. Fert.*, 65:215-221 (1982a).

McLeod, B.J., Haresing, W. and Lamming, G.E.: Response of seasonally anoestrous ewes to small-dose multiple injection of GnRh with and without progesterone pretreatment. *J. Reprod. Fert.* 65:223-230 (1982b).

McLeod, B.J. and Haresign, W.: Evidence that progesterone may influence subsequent luteal function in the ewe by modulating preovulatory follicle development. *J. Reprod. Fert.*, 71:381-386 (1984).

McLeod, B.J. and McNeilly, A.S.: Suppression of plasma FSH concentrations with bovine follicular fluid blocks ovulation in GnRH-treated seasonally anoestrous ewes. *J. Reprod. Fert.*, 81:187-194 (1987).

McNatty, K.P., Hudson, N.L., Herderson, K.M., Lun, S., Heath, D.A., Gibb, M., Ball, K., McDiarmid, J.M. and Thurley, D.C.: Changes in gonadotropin secretion and ovarian antral follicular activity in seasonally breeding sheep throughout the year. *J. Reprod. Fert.*, 70:309-321 (1984).

McNeilly, A.S.: Changes in FSH and the pulsatile secretion of LH during the delay in oestrus induced by treatment of ewes with bovine follicular fluid. *J. Reprod. Fert.* 72:165-172 (1984).

McNeilly, A.S., Fraser, H.M. and Baird, D.T.: Effect of immunoneutralization of LH releasing hormone on LH, FSH and ovarian steroid secretion in the preovulatory phase of the oestrous cycle in the ewe. *J. Endocr.* 101:213-219 (1984).

McNeilly, A.S.: Effect of Changes in FSH induced by bovine follicular fluid and FSH infusion in the preovulatory phase on subsequent ovulation rate and corpus luteum function in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 74:661-668 (1985).

McNeilly, A.S. and Fraser, H.M.: Effect of gonadotrophin-releasing hormone agonist-induced suppression of LH and FSH on follicle growth and corpus luteum function in the ewe. *J. Endocr.* 115:273-282 (1987).

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).

McNeilly, A.S., Picton, H.M., Campbell, B.K. and Baird, D.T.: Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 43:177-186 (1991).

McNeilly, A.S., Crow, W.J. and Fraser, H.M.: Suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion by gonadotrophin-releasing hormone antagonist does not affect episodic progesterone secretion or corpus luteum function in ewes. *J. Reprod. Fert.* 96:865-874 (1992a).

McNeilly, A.S., Crow, W., Brooks, J. and Evans, G.: Luteinizing hormone pulses, follicle-stimulating hormone and control of follicle selection in sheep. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 45:5-19 (1992b).

Medhamurthy, R., Carruthers, T.D. and Manns, J.G.: Effects of bovine follicular fluid inhibin on serum gonadotrophin concentrations in ewes during oestrus. *J. Reprod. Fert.* 81:91-98 (1987).

Mejía, V.O.: Efecto del líquido folicular equino en la sobrevivencia de embriones ovinos transferidos asincrónicamente. Tesis de Maestría, Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1995).

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 (1979a).

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 (1979b).



Miquelajauregui, G.E.M.: Efecto de la inhibina o flunixin-meglumine (finadyne) sobre la luteólisis en ovejas. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1993).

Monget, P. and Monniaux, D.: Growth factors and the control of folliculogenesis. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 49:321-333 (1995).

Newton, G.R., Martinod, S., Hansen, P.J., Thatcher, W.W., Siegenthaler, B., Gerber, C. and Voirol, M.J.: Effect of bovine interferon on acute changes in body temperature and serum progesterone concentration in heifers. *J. Dairy Sci.*, 73:3439-3448 (1990).

Niswender, G.D., Reimers, T.J., Diekman, M.A. and Nett, T.M.: Blood flow: A mediator of ovarian function. *Biol. Reprod.*, 14:64-81 (1976).

Niswender, G.D. and Nett, T.M.: Corpus luteum and its control in infraprimate species. In *The Physiology of Reproduction*. 2 Ed. Ed. Knobil, E. and Neill, J.D. Raven Press, Ltd. New York. 1994.

Niswender, G.D., Juengel, J.L., McGuire, W.J., Belfiore, C.J. and Wiltbank, M.C.: Luteal function: The estrous cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.* 50:239-247 (1994).

O'Shea, J.D., Rodgers, R.J. and Wright, P.J.: Cellular composition of the sheep corpus luteum in the mid- and late luteal phases of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.* 76:685-691 (1986).

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).

Parkinson, T.J., Lamming, G.E., Flint, A.P.F. and Jenner, L.J.: Administration of recombinant bovine interferon- $\alpha$  at the time of maternal recognition of pregnancy inhibits prostaglandin F $_{2\alpha}$  secretion and causes luteal maintenance in cyclic ewes. *J. Reprod. Fert.*, 94:489-500 (1992).

Pate, J.L.: Cellular components involved in luteólisis. *J. Anim. Sci.*, 72:1884-1890 (1994).

Peter, A.T., Bosu, W.K., Liptrap, R.M. and Cummings, E.: Temporal changes in serum prostaglandin F $_{2\alpha}$  and oxytocin in dairy cows with short luteal phases after the first postpartum ovulation. *Theriogenology*, 32:277-284 (1989).

Pulido, A., Zarco, L., Galina, C.S., Murcia, C., Flores, G. y Posadas, E.: Progesterone metabolism during storage of blood samples from Gyr cattle: Effects of anticoagulant, time and temperature of incubation. *Theriogenology*, 35:965-975 (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).

Quirke, J.F., Hanrahan, J.P. and Gosling, J.P.: Plasma progesterone levels throughout the oestrous cycle and release of LH at oestrus in sheep with different ovulation rates. *J. Reprod. Fert.*, 55:37-44 (1979).



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*, 41:1393-1409 (1994).

Ramírez-Godínez, J.A., Kiracofe, G.H., Shillers, R.R. and Niswender, G.D.: Endocrine patterns in the postpartum beef cow associated with weaning: A comparison of the short and subsequent normal cycles. *J. Anim. Sci.*, 55:153-158 (1982).

Raw, R.E., Curry, T.E. and Silvia, W.J.: Effects of progesterone and estradiol on the concentration and activity of cyclooxygenase in the ovine uterus. *Biol. Reprod.*, 38 Suppl. 1:104 (1988).

Robertson, D.M., Klein, R., de Vos, F.L., McLachlan, R.I., Wettenhall, R.E.H., Hearn, M.T.A., Burger, H.G. and de Kretser, D.M.: The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149:744-749 (1987).

Rodgers, R.J., O'Shea, J.D. and Bruce, N.W.: Do small and large luteal cells of the sheep interact in the production of progesterone?. *J. Reprod. Fert.*, 75:85-94 (1985).

Rodríguez, M.R.: Efecto de la suplementación sobre el inicio de la pubertad en la borrega tabasco o pelibuey. Tesis doctoral. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. 1991.

Rosas, P.J., Zarco, Q.L. y Valencia, M.J.: Efecto de un tratamiento corto de somatotropina bovina recombinante (rbST) sobre la función lútea y el desarrollo embrionario temprano de la oveja superovulada. *Vet. Mex. Supl.* 26:339 (abstr) (1995).

Roser, J.F., McCue, P.M. and Hoye, E.: Inhibin activity in the mare and stallion. *Domes. Anim. Endocr.* 11:87-100 (1994).

Ruch, F.E., Jr. and Knight, G.T.: Use of soluble and Staphylococcus aureus-immobilized second antibody compared in a radioimmunoassay for human  $\alpha$ -fetoprotein. *Clin. Chem.*, 26:1133 (1980).

Saharrea, M.A., Zarco, L.A., Valencia, M.J., Balcázar, S.A., Mejía, V.O., Luyando, G.C., Caballero, G.V. y Cerbón, G.J.: Efecto de la administración de GnRH o hCG 84 horas después de iniciado el estro sobre la función lútea y el desarrollo embrionario en cabras superovuladas. *Vet. Mex. Supl.* 26:362 (abstr) (1995).

Sauerwein, H., Miyamoto, A., Gunther, J., Meyer, H.H.D. and Schams, D.: Binding and action of insulin-like growth factors and insulin in bovine luteal tissue during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.*, 96:103- (1992).

Sawyer, H.R., Moeller, C.L. and Kozlowski, G.P.: Immunocytochemical localization of neurophysin and oxytocin in ovine corpora lutea. *Biol. Reprod.*, 34:543-548 (1986).

Scaramuzzi, R.J., Adams, N.R., Baird, D.T., Campbell, B.K., Downing, J.A., Findlay, J.K., Herderson, K.M., Martin, G.M., McNatty, K.P., McNeilly, A.S. and Tsonis, C.G.: A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod. Fert. Dev.*, 5:459-478 (1993).

Schramm, W., Bovaird, L.C., Glew, M.E., Schramm, G. and McCracken, J.A. Corpus luteum regression induced by ultra-low pulses of PGF $2\alpha$ . *Prostaglandins*, 26:347-364 (1983).

Sharpe, P.H., McKibbin, P.E., Murphy, B.D. and Manns, J.G.: First postpartum ovulation and corpora lutea in ewes which lamb in the breeding season. *Anim. Reprod. Sci.*, 10:61-74 (1986).

Sheldrick, E.L., Mitchell, M.D. and Flint, A.P.F.: Delayed luteal regression in ewes immunized against oxytocin. *J. Reprod. Fert.*, 59:37-42 (1980).

Sheldrick, E.L. and Flint, A.P.F.: Endocrine control of uterine oxytocin receptors in the ewe. *J. Endocr.*, 106:249-258 (1985).

Silvia, W.J., Fitz, T.A., Mayan, M.H. and Niswender, G.D.: Cellular and molecular mechanisms involved in luteolysis and maternal recognition of pregnancy in the ewe. *Anim. Reprod. Sci.*, 7:57-74 (1984).

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

Smith, M.F., McIntush, E.V. and Smith, G.W.: Mechanisms associated with corpus luteum development. *J. Anim. Sci.* 72:1857-1872 (1994).

Southee, J.A., Hunter, M.G., Law, A.S. 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 (1988).

Souza, C.H.J., Campbell, B.K. and Baird, D.T.: Dynamics of sheep follicular growth during anoestrus. *J. Reprod. Fert.*, 15 Abstracts: 13 (1995).

Steel, R.G.D. y Torrie, J.H.: Biostatística. Principios y procedimientos. Mac Graw Hill, México, D.F. 1985.

Stirling, D., Waterman, M.R. and Simpson, E.R.: Expression of mRNA encoding basic fibroblast growth factor (bFGF) in bovine corpora lutea and cultured luteal cells. *J. Reprod. Fert.*, 91:1-8 (1991).

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

Tsonis, C.G., McNeilly, A.S. and Baird, D.T.: Inhibin secretion by the sheep ovary during the luteal and follicular phases of the oestrous cycle and following stimulation with FSH. *J. Endocr.* 117:283-291 (1988).

Troxel, T.R. and Kesler, D.J.: Ability of indomethacin to alter prostaglandin metabolite concentration and to enhance function of induced corpora lutea in postpartum suckled beef cows. *J. Anim. Sci.*, 59:177-181 (1984).

Turzillo, A.M. and Fortune, J.E.: Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. *J. Reprod. Fert.* 89:643-653 (1990).

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

Villa-Godoy, A., Ireland, J.J., Wortman, J.A., Ames, N.K., Hughes, T.H. and Fogwell, R.L.: Effect of ovarian follicles on luteal regression in heifers. *J. Anim. Sci.*, 60:519-527 (1985).

Voss, A.K. and Fortune, J.E.: Levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase and P450 aromatase in preovulatory bovine follicle decrease after the luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, 132:2239-2245 (1993).

Wallace, J.M. and McNeilly, A.S.: Increase in ovulation rate after treatment of ewes with bovine follicular fluid in the luteal phase of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.* 73:505-515 (1985).

Wallace, J.M. and McNeilly, A.S.: Changes in FSH and the pulsatile secretion of LH during treatment of ewes with bovine follicular fluid throughout the luteal phase of the oestrous cycle. *J. Endocr.*, 111:317-327 (1986).

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

Webb, R. and England, B.G.: Identification of the ovulatory follicle in the ewe: Associated changes in the follicular size, thecal and granulosa cell luteinizing hormone receptors, antral fluid steroids, and circulating hormones during the preovulatory period. *J. Endocr.* 110:873-881 (1982).

White, L.M., Keisler, D.H., Dailey, R.A. and Inskeep, E.K.: Characterization of ovine follicles destined to form subfunctional corpora lutea. *J. Anim. Sci.*, 65:1595-1601 (1987).

Wiltbank, M.C., Dysko, R.C., Gallagher, K.P. and Keyes, P.L.: The relationship between blood flow and steroidogenesis in the rabbit corpus luteum. *J. Reprod. Fert.*, 84:213 (1988).

Wiltbank, M.C., Gallagher, K.P., Christensen, A.K., Brabeo, R.K. and Keyes, P.L.: Physiological and immunocytochemical evidence for a new concept of blood regulation in the corpus luteum. *Biol. Reprod.*, 42:139-149 (1990).

Wiltbank, M.C. and Niswender, G.D.: Functional aspects of differentiation and degeneration of the steroidogenic cells of the corpus luteum in domestic ruminants. *Anim. Reprod. Sci.*, 28:103-110 (1992).

Wiltbank, M.C.: Cell types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. *J. Anim. Sci.*, 72:1873-1883 (1994).

Wood, S.C., Glencross, R.G., Bleach, E.C.L., Lovell, R., Beard, A.J. and Knight, P.G.: The ability of steroid-free bovine follicular fluid to suppress FSH secretion and delay ovulation persist in heifers actively immunized against inhibin. *J. Endocr.* 136: 137-148 (1993).

Zárate, M.J.: Efecto de la aplicación de líquido folicular equino libre de esteroides sobre la función lútea de ovejas en anestro estacional inducidas a ovular con hCG. Tesis de Maestría. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1996.

Zarco, Q.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).

Zarco, Q.L., Stabenfeldt, G.H., Quirke, J.F., Kindahl, H. and Bradford, G.E.: Release of prostaglandin F-2 $\alpha$  and the timing of events associated with luteolysis in ewes with oestrous cycles of different lengths. *J. Reprod. Fert.*, 83:517-526 (1988a).

Zarco, Q.L., Stabenfeldt, G.H., Basu, S., Bradford, G.E. and Kindahl, H.: Modification of prostaglandin F-2 $\alpha$  synthesis and release in the ewe during the 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 prostaglandins F2 $\alpha$  during luteolysis in the ewe. *Biol. Reprod.*, 45:395-403 (1991).

Zollers, W.G., Garverick, H.A. and Smith, M.F.: Oxytocin-induced release of prostaglandin F2 $\alpha$  in postpartum beef cows: Comparison of short versus normal luteal phases. *Biol. Reprod.*, 41:262-267 (1989).