

01672

3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

UTILIZACIÓN DE ESPONJAS VAGINALES IMPREGNADAS
CON ACETATO DE FLUOROGESTONA POSTERIOR A LA
MONTA EN CABRAS SUPEROVULADAS PARA REDUCIR EL
EFECTO DE LA REGRESIÓN LÚTEA PREMATURA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

P R E S E N T A D A P O R :

J. JULIO CÉSAR CERVANTES MORALI

29/1/05



TUTOR: DR. JAVIER VALENCIA MÉNDEZ
COMITÉ TUTORIAL: DR. HÉCTOR VERA ÁVILA
DR. LEONEL MARTÍNEZ ROJAS

MEXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mis padres Carlos y Teresa, por quienes existo y a quienes debo lo que soy.

A mis hermanos: Patricia, Carlos, Jorge, Guillermo y Bibiana, quienes han sido ejemplo de dedicación, responsabilidad y honestidad, en especial a ti Chapa que estoy seguro estas con nosotros en todo momento.

A mi esposa Rita por su apoyo incondicional y por compartir su vida conmigo.

A mis sobrinos: Pau, San, Carlitos, Memito, Nicole, Bruno y Miranda.

Agradecimientos

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por darme esta oportunidad de superación.

A mis tutores: Dr. Javier Valencia Méndez, Dr. Héctor Vera Ávila, Dr. Leonel Martínez Rojas por su disposición y dedicación.

A mis asesores: Dra. Lourdes Juárez Mosqueda, Dr. Octavio Mejía Villanueva, Dr. Manuel Berruecos Villalobos por toda su paciencia y dedicación.

Al Dr. Gerardo Perera Marín, Dra. Clara Murcia Mejía y Dra. Susana Rojas Maya por su valiosa ayuda para obtener los perfiles de progesterona.

Al personal del Departamento de Reproducción, en especial a mis amigos: Vero, Malli, Víctor y Miguel, gracias por todas sus atenciones.

A Xochitl Hernández Martínez por ser también una gran amiga y por haberme ayudado en mis estudios.

A mis profesores mil gracias.

A las cabras del CEIPSA, que aun cuando no accedieron, participaron e hicieron posible este trabajo.

INDICE

I.	INTRODUCCION.....	1
II.	REVISION DE LITERATURA.....	3
	2.0 Tratamientos superovulatorios en la cabra.....	3
	2.1 Antecedentes foliculares en la formación del cuerpo lúteo.....	5
	2.2 Formación del cuerpo lúteo.....	5
	2.3 El cuerpo lúteo y la producción de progesterona.....	6
	2.4 Estructura del cuerpo lúteo.....	8
	2.5 Regresión del cuerpo lúteo.....	11
	2.6 Regresión prematura del cuerpo lúteo.....	16
III.	MATERIAL Y METODOS.....	20
IV.	RESULTADOS.....	25
V.	DISCUSION.....	51
VI.	CONCLUSIONES.....	68
VII.	LITERATURA CITADA.....	69

UTILIZACIÓN DE ESPONJAS VAGINALES IMPREGNADAS CON ACETATO DE FLUOROGESTONA POSTERIOR A LA MONTA EN CABRAS SUPEROVULADAS PARA REDUCIR EL EFECTO DE LA REGRESIÓN LÚTEA PREMATURA.

Resumen

Se evaluó el efecto del acetato de fluorogestona (FGA) posterior a la monta sobre el número de embriones recuperados en cabras superovuladas. Además se describió la estructura histológica de los cuerpos lúteos funcionales y en regresión. Se utilizaron 40 cabras sincronizadas con FGA y superovuladas con hormona folículo estimulante de origen porcino. Muestras sanguíneas se tomaron del día 1 (celo=día 0) hasta la recolección embrionaria (día 7) para determinación de progesterona por radioinmunoanálisis. Al finalizar el celo se aplicaron esponjas vaginales con FGA en la mitad de las hembras, retirándose justo antes de la recolección de embriones, la cual se realizó por laparotomía medio ventral, clasificando en ese momento los cuerpos lúteos como normales o en regresión. Las estructuras recuperadas fueron clasificadas en embriones transferibles y no transferibles. En 9 animales se realizó ovariectomía unilateral para obtener cuerpos lúteos, procesándolos para microscopía óptica y electrónica. Como resultado del lavado uterino se obtuvo un promedio de 7.6 ± 1.60 estructuras totales para el grupo testigo y 6.9 ± 1.56 para el grupo tratado ($P > .05$). Para embriones transferibles, no hubo diferencia ($P > .05$) entre el grupo testigo y el tratado (6.0 ± 1.5 vs 4.7 ± 1.5) a pesar de que el tratado presentó mayor cantidad de cuerpos lúteos en regresión en comparación con el testigo (63.1 vs 22.2%). En los casos de regresión lútea, ésta fue confirmada por descenso prematuro de progesterona, por las características macroscópicas y por hallazgos histológicos. En la microscopía óptica y electrónica, se distinguieron dos poblaciones de células esteroideogénicas: células lúteas grandes y chicas. En los cuerpos lúteos funcionales, las células lúteas grandes fueron poliédricas con un núcleo redondo y un nucleolo prominente. Las células pequeñas, distribuidas entre las células grandes mostraron núcleos de forma irregular y se tiñeron más basófilamente. Los cuerpos lúteos en regresión tuvieron abundante infiltración de tejido conjuntivo y una notoria disminución del tamaño celular. Tanto en las células pequeñas como en las grandes el núcleo presentó material nuclear condensado. Ultraestructuralmente, en los cuerpos lúteos funcionales, las células grandes se caracterizaron por presentar un núcleo esférico central y un nucleolo prominente. Los componentes citoplasmáticos más abundantes fueron el retículo endoplásmico liso y mitocondrias. Las células pequeñas presentaron un núcleo oval de contorno irregular. Su citoplasma contuvo gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso y menor cantidad de mitocondrias en comparación con las células grandes. El tejido en regresión mostró una población celular con contornos irregulares y abundante cantidad de lípidos. Los estados avanzados de regresión lútea se caracterizaron por una atrofia celular general, gran cantidad de matriz extracelular y fibras de colágeno. En la mayor parte de las células se observó condensación y fragmentación de material nuclear siendo un rasgo característico del proceso de apoptosis. Se concluye que la aplicación de FGA postmonta en cabras superovuladas mejora la recuperación embrionaria y que las características estructurales de los cuerpos lúteos tanto funcionales como en regresión de la cabra, coinciden con descripciones hechas en otras especies.

UTILIZACION DE ESPONJAS VAGINALES IMPREGNADAS CON ACETATO DE FLUOROGESTONA POSTERIOR A LA MONTA EN CABRAS SUPEROVULADAS PARA REDUCIR EL EFECTO DE LA REGRESION LUTEA PREMATURA.

I. Introducción

La superovulación, seguida de la recuperación y transferencia de embriones ha probado ser un método efectivo para incrementar la contribución de aquellas hembras consideradas genéticamente superiores. ^{1,2,3}

La técnica de transferencia embrionaria en ovejas y cabras ha tenido baja aceptación debido principalmente, a la variabilidad en la respuesta ovárica a los tratamientos superovulatorios aun en animales aparentemente similares. ^{3,4,5} Además de la variabilidad asociada a la utilización de diferentes tratamientos superovulatorios, se ha observado que pueden influir en la respuesta otros factores como son: la época del año, las características genéticas individuales y la nutrición.³ Esta variabilidad se observa incluso en el mismo animal tratado a diferentes tiempos. Sin embargo, no existen explicaciones claras para estos fenómenos. ⁶

En el caso particular de las cabras, un problema adicional frecuentemente asociado con la superovulación, es la regresión prematura del cuerpo lúteo. Esta condición se ha encontrado en algunos casos por arriba del 27% de los animales tratados, y está relacionada a tasas reducidas de recuperación embrionaria. Esto es debido a que la falla lútea, provoca una reducción en la secreción de progesterona durante los primeros días después de la ovulación, y es detrimental para la migración embrionaria a través del oviducto. ^{7,8}

La falla lútea se refleja en los niveles de progesterona plasmática. Después de un incremento inicial que coincide con la formación del cuerpo lúteo, hay un decremento súbito de progesterona entre el tercero y cuarto día posterior al servicio. ^{9,10}

La regresión prematura del cuerpo lúteo en la cabra es uno de los factores más importantes que hacen que los resultados a la superovulación sean menos predecibles que en ninguna otra especie de interés pecuario. ¹¹

II. Revisión Bibliográfica.

2.0 Tratamientos superovulatorios en la cabra.

Las dos gonadotropinas más ampliamente utilizadas para inducir la superovulación en las hembras han sido la gonadotropina coriónica equina (eCG) y la hormona folículo estimulante (FSH).¹² La falla lútea temprana en la cabra ocurre independientemente del método de sincronización de estros y del tratamiento superovulatorio utilizado.¹³

Los primeros experimentos donde se utilizó la eCG para inducir la superovulación en la cabra, resultaron en tasas ovulatorias bajas acompañadas por un gran número de folículos grandes que no ovularon. Estudios posteriores revelaron que el uso de la FSH incrementa la tasa ovulatoria, así como la tasa de recuperación de embriones transferibles.²

Como se mencionó, la regresión lútea prematura ocurre independientemente del tratamiento superovulatorio utilizado; sin embargo, la FSH presenta una gran ventaja con respecto a la eCG y es la menor proporción de animales con falla lútea temprana, probablemente atribuible a las menores concentraciones de estradiol plasmático observadas en animales tratados con FSH; sin embargo, tiene la desventaja de que es más costosa y su administración implica más manejo.^{9,14}

Debido a su larga vida media, una sola aplicación de eCG provee los niveles requeridos de gonadotropina para la superovulación; desafortunadamente la eCG también tiene la propiedad de actuar como hormona luteinizante, lo cual puede causar efectos indeseables como la maduración anormal de ovocitos y la excesiva producción de estrógenos, que se asocia con la regresión lútea temprana.^{15,16}

En comparación con los animales tratados con FSH, en aquellos en los que se utiliza eCG se han encontrado cantidades significativamente más altas de estradiol al término de la sincronización estral asociada a la superovulación.¹⁷

Una explicación posible para el regreso temprano a estro en aquellas cabras tratadas con eCG, puede ser la falla en la ovulación por parte de folículos grandes que no respondieron al pico preovulatorio de hormona luteinizante (LH).¹²

Armstrong y colaboradores (1983)^{15,18} encontraron que en cabras tratadas con eCG, la cantidad de estos folículos era mayor en comparación con aquellas en las que se utilizó FSH.

Es posible que la ovulación prematura y los perfiles endocrinos anormales observados en cabras superovuladas puedan estar inducidos por altas concentraciones de LH.^{2,16}

Se han observado respuestas ováricas poco satisfactorias en cabras tratadas con preparaciones de FSH con un alto contenido de LH. Lo anterior sugiere que una alta proporción de LH es poco favorable para la foliculogénesis normal, lo que en el bovino conlleva a ovulaciones prematuras o alteraciones en cuanto al tiempo de ocurrencia del pico preovulatorio de LH¹⁹; a desórdenes en la maduración citoplásmica o nucleica de los ovocitos tanto en el bovino como en el ovino^{4,19} y a la luteinización prematura de células de la granulosa en la rata.¹⁹ Por otro lado, preparaciones de FSH muy purificadas también dan tasas ovulatorias pobres.⁴

Si bien las proporciones de FSH con respecto a LH en las preparaciones de gonadotropinas usadas en la superovulación, no reducen la variabilidad individual en la respuesta superovulatoria; una combinación de FSH con 40% de LH ha probado ser un tratamiento superovulatorio prometedor en la cabra Boer.⁴

Generalmente, la estimulación hormonal repetida en varias ocasiones es acompañada por una reducción en la respuesta ovárica, que se traduce en una menor producción de embriones, lo cual generalmente no puede corregirse incrementando la cantidad de gonadotropina aplicada.²⁰

En el ser humano y en los animales, la administración repetida de gonadotropinas puede ser responsable de la producción de anticuerpos y del subsecuente fenómeno de refractariedad. Los anticuerpos aparecen desde la primera aplicación y después de dos o tres tratamientos la tasa de recuperación embrionaria disminuye abruptamente. Existe una elevada correlación entre los niveles de anticuerpos y la respuesta superovulatoria. La refractariedad en las cabras se ha asociado con altos niveles de anticuerpos.^{3,21}

2.1 Antecedentes foliculares en la formación del cuerpo lúteo.

Los cambios endocrinos y celulares dentro del folículo periovulatorio, durante el pico de hormona luteinizante, son importantes en la preparación de las células foliculares para la luteinización y la subsecuente secreción de progesterona. El ambiente endocrino de un folículo periovulatorio es único, ello en relación al de los folículos no ovulatorios que lo rodean.^{22,23,24}

El cuerpo lúteo es considerado como una fase más del desarrollo folicular, por lo que es necesaria la acción coordinada tanto de FSH como de LH en la adecuada preparación de las células foliculares.²²

La maduración folicular preovulatoria resulta de la acción coordinada de la LH y FSH sobre las células de la teca y de la granulosa respectivamente. En respuesta a LH, las células de la teca interna sintetizan andrógenos. Los andrógenos entran a las células de la granulosa donde son convertidos a 17 beta estradiol por la enzima aromatasa, la cual es regulada por la FSH. Además, en las células de la granulosa la FSH estimula la división celular, la formación del antro, la viabilidad celular (*in vitro*) y la síntesis de receptores para gonadotropinas.²³

Varios estudios han sugerido que un cuerpo lúteo de corta duración puede ser el resultado de un desarrollo folicular inadecuado²⁵; adicionalmente, eventos posteriores a la ovulación se pueden asociar a una función lútea anormal. Las posibles influencias pueden estar dadas por: un inadecuado estímulo luteotrópico y/o la inhabilidad del cuerpo lúteo para responder a este estímulo; una liberación temprana de luteolisina o bien por un incremento en la sensibilidad del cuerpo lúteo a la misma.²² Estudios recientes indican que los cuerpos lúteos de corta duración son debidos a la secreción prematura de PGF₂ α uterina.²⁶

2.2 Formación del cuerpo lúteo.

La formación del cuerpo lúteo es causada por efecto de un pico de LH sobre el folículo preovulatorio y está caracterizada por un incremento en el flujo sanguíneo y alteraciones celulares en tamaño, número, estimulación hormonal y concentraciones enzimáticas que permiten un cambio en la esteroidogénesis

encaminado a la producción de progesterona.^{27,28} Esta diferenciación es un proceso complejo, en el que las células de la granulosa y de la teca interna provenientes del folículo que ovuló, se diferencian en células lúteas grandes y chicas respectivamente, existiendo evidencia morfológica e inmunológica de esta diferenciación.²⁹

Además de las células lúteas chicas y grandes, los tipos celulares que han sido identificados en el cuerpo lúteo de los rumiantes domésticos, comprenden fibroblastos, células endoteliales y pericitos.²⁹

El pico preovulatorio de LH induce una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que resultan en una reorganización de las células foliculares para formar el cuerpo lúteo. Después de la ruptura del folículo hay un dramático plegamiento de la pared folicular que aparentemente facilita la migración de fibroblastos, células endoteliales y células de la teca interna hacia la región central del cuerpo lúteo en formación ²⁹, lo que a su vez, favorece la invasión de vasos sanguíneos hacia el antro folicular, desarrollándose una extensa red vascular, que lo transforman en el tejido más irrigado del organismo.^{29,30} Durante la luteinización hay una hipertrofia e hiperplasia de las células de la teca, las cuales migran hacia lo que fue la cavidad folicular y se dispersan entre las células de la granulosa luteinizadas. Las células de la granulosa incrementan el retículo endoplásmico liso y las mitocondrias se tornan redondeadas y acumulan en su citoplasma gránulos de glucógeno. Después de la ovulación, las células de la teca tienen actividad mitótica, lo que aparentemente no sucede con las células de la granulosa luteinizadas.³

La migración y proliferación de células endoteliales esta regulada por factores angiogénicos y antiangiogénicos. El origen celular de las sustancias que promueven la migración y proliferación endotelial durante el desarrollo lúteo es desconocido.²⁹

2.3 El cuerpo lúteo y la producción de progesterona.

El cuerpo lúteo se ha considerado una glándula endocrina temporal, que se desarrolla después de la ovulación. El cuerpo lúteo secreta básicamente

progesterona, la cual es un importante regulador de la duración del ciclo estral y es esencial para el mantenimiento de la gestación.^{23,31}

Se sabe que ninguna otra hormona esteroide se produce en cantidades significativas en el cuerpo lúteo ovino y no se ha encontrado una explicación del porqué se requieren dos tipos celulares para la síntesis de progesterona; se cree que ambas células pueden tener funciones distintas, como es la producción de oxitocina en el cuerpo lúteo la cual es exclusiva de las células lúteas grandes.^{32,33} Otra posibilidad es que las células lúteas, chicas y grandes requieran interactuar en alguna forma para la producción de progesterona, sin embargo no se han encontrado evidencias que apoyen esta posibilidad.

Bioquímicamente, la biosíntesis de hormonas esteroideas es regulada por la disponibilidad de colesterol y la expresión de enzimas esteroideogénicas específicas.²⁹

La producción de progesterona por parte de las células lúteas se incrementa más de 10 veces debido a un aumento de las enzimas que la producen, mientras que la producción de andrógenos y estrógenos decrece debido a la pérdida en la actividad de las enzimas que los sintetizan. Además, parte del incremento de la producción de progesterona puede ser atribuido al aumento del flujo sanguíneo hacia el cuerpo lúteo, lo que permite la utilización de lipoproteínas séricas como fuente de colesterol para la esteroideogénesis.²⁷

Conforme progresa la luteinización, la hormona luteinizante (LH) induce la producción de progesterona por parte de las células chicas estimulando la producción de adenosin monofosfato cíclico (AMPc), por el contrario las células lúteas grandes tienen una producción basal muy elevada de progesterona que rebasa la producción de las células chicas y que no parece ser dependiente de LH o de la producción de AMP cíclico.^{27,28,29} En el cuerpo lúteo ovino se ha observado que el número de receptores para LH alcanza su máximo alrededor del día 10 del ciclo estral.³⁰ Por otro lado, se ha estimado que aproximadamente el 80% de la progesterona secretada en el cuerpo lúteo ovino proviene de las células lúteas grandes.²⁹

Como se mencionó anteriormente, el mecanismo por el cual la LH estimula la secreción de progesterona por parte de las células chicas, involucra la formación de AMPc el cual causa la activación de la proteína cinasa A, la que a su vez estimula la actividad de la enzima colesterol estearasa. Además, la LH puede favorecer el transporte de colesterol hacia la membrana mitocondrial.³⁰

En la oveja la secreción de progesterona es pulsátil. Algunos de estos pulsos son precedidos por un pulso de LH, los cuales tienen variaciones en frecuencia, que van de aproximadamente uno cada hora en el día 1 posterior al estro, a un pulso cada 4-6 horas en el día doce de la fase lútea.²⁸

2.4 Estructura del cuerpo lúteo.

La mayor parte del parénquima del cuerpo lúteo consiste de células esteroideogénicas.³⁰ El número total de células nucleadas en el cuerpo lúteo ovino se ha estimado en alrededor de 250 millones. Dentro de esta población las células endoteliales y pericitos son el tipo celular más abundante, expresado en porcentaje comprenden el 56.2% del total, mientras que las células lúteas grandes son las menos numerosas con 4.2%. Las células lúteas chicas y fibroblastos se encuentran en un número intermedio con un 18.5 y 16.8% respectivamente, el restante 7.9% está ocupado por tipos celulares misceláneos.^{30,34,35} Se ha estimado una relación de células chicas con respecto a las grandes de alrededor de 4.5:1. Las células lúteas grandes con una densidad de volumen de aproximadamente 25% ocupan más lugar que ningún otro tipo celular.^{34,35}

En la oveja se distinguen dos tipos de células esteroideogénicas con una notoria diferencia en el tamaño. A partir de los trabajos realizados con microscopía óptica y electrónica, se puede resumir lo siguiente con respecto al cuerpo lúteo:

Morfológicamente, las células chicas son fusiformes de 12 a 18 micrómetros de diámetro con un contorno poco definido, que contienen un núcleo de forma irregular debido a proyecciones de la membrana nuclear y uno o más nucleolos; el citoplasma de estas células usualmente se tiñe más oscuro que el de las células grandes y posee numerosas mitocondrias, gotas de lípidos y un abundante

retículo endoplásmico liso característico de las células esteroideogénicas.^{30,36,37,38} En contraste, las células lúteas grandes son poliédricas, pero relativamente uniformes, con un rango de diámetro de entre 25 a 40 micrómetros, contiene un núcleo redondo central sin proyecciones nucleares y un abundante citoplasma; el número de mitocondrias es mayor en éstas células que en las células chicas lo que se relaciona con la gran producción basal de progesterona por parte de estas células, también contienen gotas de lípidos y abundante retículo endoplásmico liso. En comparación con las células chicas, las células lúteas grandes tienen abundante retículo endoplásmico rugoso y un tipo único de gránulos secretores electrodensos.^{30,36,38,39} Existe controversia en cuanto al contenido de estos gránulos: algunos autores proponen que estos gránulos contienen progesterona y que toman parte en la secreción de la misma. Estos gránulos son redondos y limitados por una membrana simple. Se asume que las hormonas esteroideas viajan por difusión simple de su sitio de síntesis hacia la superficie celular para ser liberadas. Sin embargo una alternativa posible es que la progesterona recién sintetizada sea envuelta con su proteína de unión en un gránulo que, bajo la estimulación apropiada, libera su contenido por exocitosis hacia el espacio extracelular.^{40,41} Por otro lado, en trabajos más recientes³⁰ se ha propuesto que los gránulos contienen oxitocina la cual es liberada por exocitosis; sin embargo, se ha descrito que conforme la luteólisis progresa, éstos gránulos disminuyen su número lo que podría apoyar la primera alternativa.⁴¹

Se considera que las células chicas y las células grandes se derivan de las células de la teca y de la granulosa respectivamente, aunque existe controversia con respecto a si las células chicas se diferencian o transforman en células lúteas grandes durante el ciclo estral, pero no se ha evidenciado transformación entre ellas.^{37,39} La relación estructural que guardan las células lúteas es estrecha dando el aspecto de que cada célula grande está en aposición con por lo menos una, pero generalmente con varias células chicas y a su vez, ambas se encuentran estrechamente asociadas con células no esteroideogénicas.^{37,38}

Mientras que el número de células chicas se incrementa durante el ciclo estral, su tamaño permanece relativamente constante. Por el contrario, las células lúteas grandes permanecen constantes en número, pero incrementan su tamaño conforme el ciclo progresa.³⁸

Se han descrito los cambios estructurales que experimentan las células del cuerpo lúteo durante la luteólisis. Durante un ciclo normal en la oveja, los primeros cambios se identificaron al día 14 siendo más consistentes al día 16.⁴² Umo⁴³ encontró en borregas cíclicas al día 15 del ciclo una evidente desorganización celular, marcada por una disminución en el tamaño de las células e invasión masiva de colágeno.^{43,44} Dentro de los cambios más constantes, se encontró un incremento en las gotas de lípidos en el citoplasma, que se explica por la disminución de la actividad secretora de las células esteroideogénicas, debido a la incapacidad de estas para convertir los lípidos a hormonas esteroideas, acumulándose las gotas de colesterol esterificado en la célula lútea.^{41,43,44,45} Además se ha descrito segmentación del retículo endoplásmico liso, alteraciones en la densidad mitocondrial, desaparición de gránulos secretores y numerosos cuerpos autofagocíticos que se ha demostrado que están involucrados en la digestión de componentes intracelulares en diferentes tipos celulares.^{41,46} Estos cuerpos autofagocíticos (lisosomas secundarios) pueden detectarse después de la infusión experimental de prostaglandina F2 α , junto con la desaparición de los gránulos secretores.⁴⁴

Al mismo tiempo los vasos sanguíneos se llenan con detritus celulares, muchos de los cuales representan fragmentos de células endoteliales.^{42,45} Un hallazgo frecuente dentro de éstos detritus es la presencia de cuerpos basófilos densos y homogéneos identificados como remanentes nucleares. Con microscopía electrónica, dentro de los capilares se observan fragmentos celulares electrodensos, generalmente envueltos por membrana; muchos de estos fragmentos contienen organelos citoplasmáticos y masas extremadamente densas de tamaño y forma variable aparentemente equivalentes a los remanentes nucleares vistos con microscopía óptica.⁴⁵ Con el uso de la microscopía

electrónica se ha establecido que muchos de estos detritus están compuestos de fragmentos celulares degenerados muy similares a cuerpos apoptóticos descritos por Kerr y citado por O'Shea.^{39,42}

En los cuerpos lúteos en regresión, alrededor del día 14 ó 15 de un ciclo estral normal, algunas células muestran cambios nucleares particularmente en la cromatina que puede estar agrupada en masa o tener una disposición marginal.⁴²

Sawyer y colaboradores han encontrado cambios morfológicos indicativos de apoptosis en los núcleos de las células esteroidogénicas, fibroblastos y células endoteliales en cuerpos lúteos de animales tratados con prostaglandina F2 α (PGF2 α). Al parecer estos cambios no son sincrónicos, siendo evidentes en primer lugar en la células endoteliales, en segundo en las células lúteas y por último en fibroblastos. Durante las fases finales de la luteólisis, las células lúteas degeneradas sufren lisis celular y son removidas por macrófagos, quedando las células endoteliales y fibroblastos que se reorganizan para formar el *corpus albicans*.⁴⁵

Se ha observado que al mismo tiempo que ocurren éstos cambios los niveles de progesterona disminuyen.^{42,46}

2.5 Regresión del cuerpo lúteo.

En los rumiantes domésticos, la PGF2 α secretada por el útero de animales no gestantes es responsable de la luteólisis.²⁷ El momento en el que el cuerpo lúteo es sensible a la PGF2 α depende de cada especie.²³

La PGF2 α es producida en el útero bajo la influencia del estradiol y la progesterona. En el caso de rumiantes domésticos, alrededor del día 12 a 14 del ciclo estral, es liberada de manera pulsátil hacia la vena útero-ovárica y de ahí es transferida a la arteria ovárica, por un mecanismo de intercambio contra-corriente en el pedículo ovárico.^{28,47} La PGF2 α es liberada por el útero en una serie de 5 a 8 pulsos. Existe variación entre especies en cuanto a la duración y magnitud de los pulsos, pero normalmente ocurren a intervalos de 6 a 8 horas. Estos pulsos

aparecen antes de la caída en las concentraciones de progesterona y son inducidos a su vez por una secreción pulsátil de oxitocina la cual es secretada en su mayor parte por el cuerpo lúteo.^{27,47,48,49}

Debido a que la $PGF2\alpha$ puede estimular la secreción de oxitocina lútea, existe evidencia de que ocurre una estimulación recíproca durante la luteólisis entre $PGF2\alpha$ uterina y oxitocina lútea.^{27,50}

Cuando a una oveja se le administra prostaglandina $F2\alpha$, los niveles de oxitocina se incrementan en la vena ovárica ipsilateral al cuerpo lúteo.²³ En el cuerpo lúteo ovino están presentes grandes cantidades de oxitocina y parece estar localizada primariamente en las células lúteas grandes, las cuales poseen una estructura compatible con la síntesis de polipéptidos, así como con su secreción.^{33,36}

El estímulo que inicia la secreción de $PGF2\alpha$ es desconocido. Una posibilidad es que el útero reciba una señal externa dada de manera pulsátil por otro órgano; un candidato para esta señal externa es la oxitocina secretada por la neurohipófisis.⁴⁹ Silvia *et al.*⁴⁹, propusieron el siguiente modelo para explicar como se genera el patrón pulsátil de secreción de $PGF2\alpha$: el útero libera $PGF2\alpha$ en respuesta a uno o más de los pulsos de oxitocina hipofisiaria. Los bajos niveles de $PGF2\alpha$ liberada en respuesta a la oxitocina neurohipofisiaria dispara la liberación adicional de oxitocina del cuerpo lúteo. La oxitocina lútea tiene por lo menos dos probables efectos; 1) estimula una mayor liberación de $PGF2\alpha$ uterina; 2) concentraciones elevadas de oxitocina pueden ser requeridas para inducir la refractariedad uterina a la misma oxitocina. La refractariedad transitoria inducida a nivel del útero interrumpe la estimulación recíproca durante las siguientes 6 horas. Así, el útero estará incapacitado para secretar $PGF2\alpha$ en respuesta a oxitocina hasta que la refractariedad desaparezca, lo que da como resultado la secreción pulsátil de $PGF2\alpha$ a intervalos de 6 a 8 horas.^{49,51}

Durante un ciclo estral normal, en las etapas temprana e intermedia de la fase lútea se observa un período inhibitorio por parte de la progesterona sobre los

receptores uterinos a oxitocina y estradiol, después del cual el estradiol es capaz de estimular el mecanismo luteolítico, asegurándose que el útero responda a la oxitocina con un incremento en la secreción de prostaglandina. Hacia el final de la fase lútea, la progesterona pierde su efecto inhibitorio y el estradiol se une a sus receptores para estimular a su vez el desarrollo de receptores para oxitocina; la unión de esta hormona con sus receptores promueve la liberación de prostaglandina F₂α por parte del útero.^{23,30,52,53}

El 17 beta estradiol promueve la secreción uterina de PGF₂α, en respuesta a un estímulo dado por oxitocina y al mismo tiempo, incrementa el número de sitios de unión específica para oxitocina en el útero.^{52,53} Sin embargo, es necesaria la previa exposición a progesterona antes de que los estrógenos puedan ejercer dicho efecto estimulador en el útero. Para que el útero pueda secretar PGF₂α, debe de contar con reservas adecuadas de ácido araquidónico y así poder sintetizarla. La mayor parte del ácido araquidónico en el tejido uterino se encuentra esterificado en forma de fosfolípidos, la cantidad de ácido araquidónico que se acumule durante el ciclo estral puede indicar cuanta PGF₂α puede secretarse en respuesta a oxitocina.⁴⁹ Por esto, la exposición a largo plazo a la progesterona, promueve la liberación de PGF₂α incrementando sus precursores y la actividad de las enzimas Fosfolipasa A2 y prostaglandin sintetasa.^{23,49,53}

Una de las primeras sugerencias sobre el mecanismo de acción de la PGF₂α, fue que causaba un decremento en el flujo sanguíneo del cuerpo lúteo y que la subsecuente hipoxia dentro del tejido lúteo causaba la regresión. Aunque hay un decremento en el flujo sanguíneo al momento de la luteólisis, el flujo sigue siendo de 5 a 20 veces mayor que en el tejido ovárico circundante, lo que no coincide con hipoxia.⁵⁴ Por lo tanto, es posible que el decremento en el flujo sanguíneo que acompaña a la regresión lútea pueda deberse a degeneración de capilares lúteos más que a una vasoconstricción causada por PGF₂α.^{27,55}

La acción luteolítica de la PGF₂ alfa parece ser un efecto local, pero aún no está completamente esclarecido si la disminución en el flujo sanguíneo es el factor

principal en la iniciación de la regresión lútea o una consecuencia de la luteólisis.^{30,54}

En la oveja se ha encontrado que el número de receptores para LH disminuye después del tratamiento con PGF2 α . Sin embargo, el decremento en el número de receptores, no ocurre hasta después de un decremento significativo en las concentraciones de progesterona.³⁰

Grinwich *et al.*(1976) citados por Pate⁵⁵, encontraron que en el cuerpo lúteo de la rata, la luteólisis inducida por PGF2 α es acompañada por un decremento en el número de receptores para LH, lo cual se confirmó más tarde en ovejas. Pero este decremento en los receptores para LH ocurre por lo menos 12 horas después del decremento en la progesterona plasmática; por esto, la pérdida de receptores para gonadotropinas puede ser un efecto crónico de la PGF2 α , más que una causa inicial de la disminución de progesterona.⁵⁵

Se sugiere que los efectos luteolíticos de la PGF2 α ocurren primeramente a nivel de las células lúteas grandes, ya que estas poseen la mayoría de receptores para prostaglandinas.^{55,56} Fitz *et al.* (1982), utilizando cuerpos lúteos de ovejas superovuladas, encontraron que las células lúteas grandes contienen la mayor parte de los receptores para PGF2 α en el día 10 del ciclo estral.⁵⁶ Probablemente las células lúteas grandes responden primeramente a la señal luteolítica, pero la comunicación intercelular entre las células grandes y chicas, así como entre células lúteas y no lúteas, es necesaria para que la regresión progrese.⁵⁵

La regresión funcional del cuerpo lúteo es caracterizada por un decremento en la producción de progesterona y la regresión estructural se manifiesta por cambios en tejido lúteo, que incluyen: acumulación de gotas citoplasmáticas (lípidos), degeneración de capilares y un incremento en el número de lisosomas.^{30,55}

Cada vez hay más evidencia de que la acción antiesteroideogénica de la PGF2 α es mediada a través de la activación de la proteína cinasa A, mientras que la acción luteolítica parece manifestarse a través del proceso de apoptosis con un incremento en el calcio intracelular libre como señal que induce este proceso.³⁰

La regresión del cuerpo lúteo, tanto funcional como estructural, es esencial para la ciclicidad normal. El cuerpo lúteo debe sufrir regresión para disminuir la secreción de progesterona y permitir otro pico ovulatorio de LH y así, otro ciclo estral. También debe regresar de manera estructural (destrucción y remoción de células lúteas) para mantener al ovario en sincronía con respecto al resto del aparato reproductivo y permitir a los folículos preovulatorios crecer y posteriormente ovular.⁵⁷ La regresión estructural del cuerpo lúteo se lleva a cabo por apoptosis, la cual es un proceso de muerte celular altamente regulado, que elimina distintas poblaciones celulares a través de la activación de endonucleasas dentro de la célula.^{30,55,57} El sistema inmune puede estar involucrado en la regresión del cuerpo lúteo, evidenciado por la rápida infiltración de células del sistema inmune que provocan la luteólisis estructural, por lo que esta puede ocurrir a través del proceso de apoptosis.⁵⁵

Un marcador de apoptosis es la activación de endonucleasas dependientes de magnesio y calcio, las cuales provocan la segmentación del DNA en fragmentos llamados oligonucleosomas.⁵⁷

La actividad de las endonucleasas, evidenciada por la formación de oligonucleosomas, indica que el fenómeno de apoptósis ocurre durante la regresión lútea en el ganado bovino. Debido a que la formación de oligonucleosomas no es aparente hasta después de la caída en la progesterona, parece haber una separación entre la regresión lútea funcional (disminución de progesterona) y la regresión lútea estructural (disminución en el número de células, medida por el contenido total de DNA). Dado que las concentraciones de progesterona declinan antes de la aparición de oligonucleosomas, no es correcto pensar que la formación de estas estructuras esté involucrada en la disminución de progesterona, que define a la regresión lútea funcional. Una respuesta definitiva acerca de qué tipo de células está contribuyendo a la formación de oligonucleosomas requiere un análisis de los distintos tipos celulares del cuerpo lúteo.⁵⁷

Sawyer *et al.*, citados por Juengel *et al.* ⁵⁷ han propuesto que la isquemia, causada por la reducción del flujo sanguíneo a las células lúteas, inicia la apoptosis.

Se ha utilizado generalmente a la oveja con el fin de describir histológicamente al cuerpo lúteo. Sin embargo, la descripción histológica en la cabra al parecer no se ha documentado. La descripción del cuerpo lúteo se ha realizado en animales cíclicos o con infusiones experimentales de PGF2 α , pero no en animales superovulados ya sea con cuerpo lúteo normal o con regresión prematura.

2.6 Regresión prematura del cuerpo lúteo.

Las fases lúteas de corta duración se presentan frecuentemente durante la pubertad, después de la primera ovulación posterior al parto y al inicio de la estación reproductiva en animales anéstricos.²³

Se había sugerido que los cuerpos lúteos anormales pueden ser el resultado de un desarrollo folicular inadecuado antes del pico preovulatorio de LH. Sin embargo, Batty *et al.*, mostraron evidencias que implican la liberación prematura de PGF2 α uterina como causa de regresión lútea prematura en cabras superovuladas.^{2,25,26}

Las cabras superovuladas frecuentemente sufren regresión lútea prematura ^{7,8,9}, la cual resulta en el retorno a niveles basales de progesterona entre el día 3 y 6 posterior al estro.^{15,58} Esta disminución de progesterona provoca la pérdida de embriones antes de la colección, cuando esta se lleva a cabo en el día seis o siete después del estro.^{58,59}

Existe evidencia de que los estrógenos están involucrados en el proceso luteolítico en los rumiantes domésticos.⁶⁰ En la luteólisis normal, el estradiol proveniente de una oleada folicular durante la fase lútea tardía, juega un papel fundamental en el establecimiento del patrón de secreción de PGF2 α .⁶¹

Tanto en la vaca como en la oveja, la administración de estrógenos a la mitad del ciclo provoca regresión lútea prematura, lo que demuestra que el estradiol puede

inhibir en forma directa la función lútea, promoviendo la secreción uterina de $\text{PGF2}\alpha$.⁶¹

Cuando la superovulación en la cabra, es inducida, sobre todo con eCG la concentración de estradiol permanece elevada durante la fase lútea temprana, alcanzando un pico en el día 4 después de la presentación del estro superovulatorio.¹⁴ Este estradiol proviene de folículos que continuaron siendo reclutados, probablemente debido a la prolongada vida media de la eCG.^{14,15} La asincronía en el crecimiento folicular, puede ocasionar una falla en la ovulación, debida a la falta de receptores para LH en aquellos folículos que se encuentran en un estado de desarrollo temprano al momento del pico preovulatorio de LH.² La regresión lútea prematura es ocasionada por la liberación de $\text{PGF2}\alpha$ inducida por niveles altos de estradiol.⁵⁹

Con la finalidad de disminuir las consecuencias de una regresión prematura del cuerpo lúteo en cabras superovuladas, se han utilizado inhibidores de la síntesis de prostaglandinas como: meglumina de flunixin ⁵⁸, indometacina ²⁶ y ácido meclofenámico, ⁶² los cuales actúan inhibiendo a la enzima ciclo-oxigenasa para bloquear la utilización del ácido araquidónico; estos tratamientos implican generalmente dos administraciones diarias durante varios días, iniciando dos días después del estro, lo que representa una desventaja con respecto al manejo de los animales. Sin embargo, se ha observado que estos tratamientos reducen la incidencia de regresión lútea prematura; Gilbert *et al* ⁵⁸ utilizando meglumina de flunixin encontraron una disminución en la proporción de animales con regresión lútea en el grupo tratado en comparación con el testigo (3.3 v.s. 35.9% respectivamente). Otra opción la representan la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) las cuales actúan como agentes luteotrópicos o bien favorecen la ovulación y consecuente luteinización de folículos que no respondieron al pico de LH. Saharrea, ⁵⁹ concluye que la administración de hCG , 84 horas después de iniciado el estro, reduce la incidencia de regresión prematura en los cuerpos lúteos de cabras superovuladas, así mismo al utilizar GnRH en el mismo momento, observó una disminución en la incidencia de regresión lútea, aunque menos efectiva en comparación con el

tratamiento anterior; cuando tomaron en cuenta los niveles de progesterona el 57.5, 0 y 37.5% de las cabras tuvieron regresión prematura en el grupo testigo, con hCG y GnRH respectivamente, aunque para estos autores no está claro si los niveles de progesterona se mantuvieron al prevenir la regresión lútea o si el tratamiento ayudó a la formación de cuerpos lúteos accesorios.

Se ha propuesto además, otra alternativa que involucra la administración exógena de progesterona para reemplazar los niveles decrecientes de esta hormona asociados con la regresión prematura del cuerpo lúteo.^{58,63} Gilbert *et al.*,⁵⁸ obtuvieron embriones en el 86.9% de las cabras que recibieron un dispositivo intravaginal con progesterona, en comparación con un 75.7% en aquellos animales del grupo control. Mejía *et al.*,⁶⁴ proponen la administración de esponjas vaginales con acetato de fluorogestona en ovejas superovuladas. Estos autores colectaron mayor cantidad de embriones en el grupo tratado en comparación con el testigo (7.66 v.s.3.87, $P < .05$). La aplicación de dispositivos intravaginales representa la ventaja de manejar una sola vez a las donadoras de embriones.

JUSTIFICACION.

La transferencia de embriones es una técnica que permite acelerar el mejoramiento genético y explotar el potencial reproductivo de la hembra. Sin embargo, en la cabra la regresión prematura de los cuerpos lúteos es un fenómeno frecuente que afecta la viabilidad y recuperación de embriones por lo que es importante la búsqueda de opciones que permitan disminuir sus consecuencias.

OBJETIVOS.

Evaluar el efecto de la administración de Acetato de fluorogestona (FGA) posterior a la monta, sobre el número de embriones obtenidos al lavado uterino en cabras sometidas a esquemas de superovulación.

Describir las características histológicas de los cuerpos lúteos normales y en regresión, en la cabra superovulada.

HIPOTESIS.

La administración de esponjas vaginales conteniendo FGA durante el período que va del final del estro hasta la colección embrionaria (día 6) incrementa el número de embriones recolectados al momento del lavado uterino en cabras sometidas a esquemas de superovulación y transferencia embrionaria.

Las características de los cuerpos lúteos clasificados macroscópicamente como normales o en regresión, coincidirán en cada caso con la descripción microscópica.

III. MATERIAL Y METODOS.

Animales experimentales.

Se utilizaron 40 cabras de las razas Alpino Francés (n=15), Toggenburg (n=8), Saanen (n=7), Anglo Nubia (n=2) y cruizas entre ellas (n=8), de entre 1.5 y 7 años de edad, pertenecientes al Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Con el fin de facilitar el manejo se formaron al azar grupos de trabajo de cuatro animales cada uno.

Lugar e instalaciones.

El CEPIPSA esta ubicado en el kilómetro 28.5 de la carretera Federal México-Cuernavaca, a 19° latitud Norte y 99° longitud Oeste, a una altura de 2760 msnm. El clima de la región es c(w) (w) b (ij), que corresponde a semifrío semihúmedo con lluvias en verano, una precipitación pluvial de 800 a 1200 mm anuales y temperatura promedio anual de 19°C.⁶⁴

Los animales fueron mantenidos en estabulación completa en corrales comunales de 56m², con una densidad de entre 12-16 animales por corral, lo que resultó en un área de 3.5m² por animal como mínimo. Los corrales cuentan con bebederos automáticos. El espacio lineal de comedero no fue menor de 0.50 m por animal.

Sincronización de estros y superovulación.

Las cabras se sincronizaron con esponjas vaginales impregnadas con 40 mg de Acetato de fluorogestona por 12 días. El trabajo se llevó a cabo durante la época reproductiva. La superovulación se indujo con la administración de 180 mg (9 ml) de hormona folículo estimulante de origen porcino* (Folltropin, Vetrepharm, Canada Inc.), dividida esta dosis en dos administraciones diarias durante cuatro días con un patrón decreciente de dosificación, primer día 2.0 ml por la mañana y 1.5 por la tarde, día dos 1.5 y 1.0, día tres 1.0 ml mañana y tarde y cuarto día 0.5 en cada aplicación, iniciando la primera administración 48 horas antes del retiro

de la esponja vaginal. El día en que se manifestó el celo se designó como el día cero.

Determinación de concentraciones plasmáticas de progesterona

A partir del día uno y hasta el día de la colección de embriones, se tomaron muestras de sangre por punción yugular en tubos heparinizados, dos veces al día, para la determinación de concentraciones de progesterona plasmática por medio de radioinmunoanálisis en fase sólida (RIA).⁶⁵

Detección de calores y servicios.

La detección de calores se realizó con la ayuda de un macho celador provisto de un mandil para evitar la cópula. Los animales detectados en celo fueron servidos con machos de fertilidad probada por la mañana y por la tarde durante el tiempo que duró el celo, cada servicio constó de dos montas.

Tratamientos

Al término del período de servicios, se aplicaron al azar esponjas vaginales impregnadas con acetato de fluorogestona en dos de cuatro animales que formaron cada grupo de trabajo, designándose a partir de este momento los grupos: tratado (con esponja vaginal) y testigo (sin esponja vaginal). Las esponjas vaginales se retiraron justo antes de la colección embrionaria, al día 6 o 7 posterior al estro.⁶⁶

Colección embrionaria.

Al día 7 posterior al estro, se realizó la colección de embriones y la evaluación de las estructuras ováricas, a través de una laparotomía medio ventral anterior a la ubre, aplicando a los animales una anestesia disociativa con 0.11 mg/kg de hidrocloreuro de xilazina (Rompun, Bayer de México, México) por vía intramuscular y 1-2 mg/kg de Ketamina (Imalgen 1000 Rhone Merieux de México, México) por vía endovenosa con previo ayuno de 36 horas.⁶⁷

Una vez que el aparato reproductor fue exteriorizado, se evaluaron y registraron las estructuras ováricas, clasificando los cuerpos lúteos como normales o en regresión. De acuerdo a sus características morfológicas se consideraron normales aquellos cuerpos lúteos de color naranja o rojo brillante y con buena irrigación; y en regresión, al encontrarlos pequeños de color blanco o rosa pálido y sin irrigación marcada.³⁸

Para la recolección de los embriones, se realizó el lavado de cada cuerno con solución Dulbecco modificada a la que se agregó 4 % de albúmina sérica bovina más 100 UI/ml de penicilina G sódica. De esta solución se infundió un volumen total de 60 ml por cuerno, que se introdujo con una jeringa Air Tite estéril conectada a un angiocatéter No. 18 colocado cerca de la unión utero-tubárica. El medio fue recuperado a través de una sonda de Foley de 10 French (FR) insertada cerca de la bifurcación del útero, el medio obtenido se recibió en un filtro concentrador.⁶⁷ Las estructuras obtenidas se evaluaron en un microscopio estereoscópico y fueron clasificadas de acuerdo a su desarrollo en: ovocitos, embriones transferibles y embriones no transferibles.

Colección y procesamiento de muestras para microscopía

De los 20 animales de cada grupo se eligieron al azar 6 cabras, a las cuales se les practicó ovariectomía unilateral con la finalidad de obtener los cuerpos lúteos, los cuales una vez caracterizados macroscópicamente como funcionales o en regresión, fueron cuidadosamente extraídos del parénquima ovárico e inmediatamente cortados y fijados para microscopía óptica y electrónica.

Microscopía óptica: Se tomaron muestras de 2-3 mm de espesor de la parte central del cuerpo lúteo y se colocaron en fijador de Bouin durante 24 horas a 4°C. Después las muestras fueron lavadas con agua corriente y mantenidas en alcohol etílico al 70% hasta el momento de su procesamiento, en que fueron incluidas en parafina. Los cortes obtenidos se tiñeron con Hematoxilina-Eosina o tinción Tricrómica de Masson. Las muestras fueron observadas y fotografiadas en un foto-microscopio para su posterior análisis.

Microscopía electrónica: En este caso las muestras tuvieron un espesor aproximado de 1mm e igualmente fueron tomadas del centro del tejido lúteo. Las muestras se fijaron en fijador de Karnowsky durante 24 hrs. a 4° centígrados. Después las muestras fueron postfijadas en tetraóxido de osmio al 1% durante una hora; posteriormente se deshidrataron en concentraciones ascendentes de alcohol etílico, el cuál se sustituyó paulatinamente por resina Spur, depositando las muestras en cápsulas de Bemm para su polimerización a 60°C durante 36 horas. Se realizaron cortes semifinos en un ultra microtomo y se tiñeron con azul de Toluidina para verificar el tipo de tejido, posteriormente se realizaron cortes finos que fueron recuperados en rejillas de cobre de 200 mesh y teñidas con acetato de uranilo y nitrato de plomo. La observación se realizó en un microscopio electrónico de transmisión.

Análisis estadístico.

Para comparar la proporción entre grupos de tratamiento de cuerpos lúteos de aspecto normal, en regresión y la presencia simultánea de ambos tipos (mixtos), se utilizó la prueba de χ^2 – Cuadrada. Esta misma prueba sirvió para comparar la proporción de animales por grupo en los que se pudo recolectar alguna estructura.

Así mismo se realizó un análisis de varianza para un diseño completamente al azar, considerando el efecto de tratamiento sobre las respuestas asociadas a la calidad de la respuesta superovulatoria y de producción embrionaria. Las variables dependientes consideradas fueron: cuerpos lúteos normales, cuerpos lúteos en regresión, cuerpos lúteos totales, folículos totales, estructuras totales, ovocitos, embriones transferibles y embriones no transferibles.

Adicionalmente y para valorar el posible efecto positivo del tratamiento en condiciones problema derivadas de la superovulación, se realizó un análisis de varianza para un diseño completamente al azar considerando únicamente los animales con falla lútea (niveles de progesterona por debajo de 1 ng/ml en los muestreos previos a la colección) y las variables dependientes: estructuras totales, ovocitos, embriones transferibles y embriones no transferibles.

Los niveles plasmáticos de progesterona se compararon mediante un análisis de varianza para un diseño de observaciones repetidas, considerando al efecto de tratamiento como factor de variación entre unidades experimentales y el momento de muestreo y su interacción con el tratamiento como factores de variación dentro de unidad experimental.

Por último, se realizó un análisis de correlación en forma independiente por grupo de tratamiento entre los dos últimos muestreos de progesterona previos a la colección (12º y 13º) y las estructuras totales, embriones transferibles y embriones no transferibles.

IV. Resultados

Respuesta a la sincronización y superovulación.

De las 40 cabras consideradas para este estudio, 39 mostraron celo y fueron servidas, lo que representó una respuesta a la sincronización del 97.5%; el único animal que no respondió, era parte del grupo testigo. Al momento de la recolección embrionaria, se eliminaron dos cabras más, una del grupo testigo porque no mostró respuesta a la superovulación y otra del grupo tratado, por observarse quistes ováricos a la exteriorización del aparato reproductor.

Estructuras observadas y recuperadas al lavado uterino.

Del total de animales en el grupo testigo, el 66.6% mostraron a la exteriorización del aparato reproductor, sólo cuerpos lúteos de aspecto normal; el 22.2% solo cuerpos lúteos en regresión y el 11.1% la combinación de ambos tipos. En el grupo tratado el 5.3% mostró cuerpos lúteos de aspecto normal, el 63.1% en regresión y el 26.3 mixtos, dentro de este grupo en un animal se identificaron solo folículos y representó el 5.2% (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentajes de estructuras encontradas a la exteriorización de los ovarios.

Grupo	CL normales	CL regresión	CL mixtos
Testigo	66.6 <i>a</i>	22.2 <i>a</i>	11.1 <i>a</i>
Tratado	5.3 <i>b</i>	63.1 <i>b</i>	26.3 <i>a</i>

a, b Diferente literal en la columna, significa diferencia estadística entre grupos ($p < .05$)

Los porcentajes fueron analizados con la prueba de χ^2 - cuadrada y se encontraron diferencias estadísticas entre los porcentajes del grupo testigo y el tratado en los cuerpos lúteos normales y los cuerpos lúteos en regresión, no así en los cuerpos lúteos mixtos. Se observó que hubo un mayor porcentaje de cuerpos lúteos normales en el grupo testigo, mientras que los cuerpos lúteos en regresión fueron más frecuentes en el grupo tratado.

Las estructuras ováricas observadas a la exteriorización del aparato reproductor así como de las estructuras obtenidas después del lavado uterino en ambos grupos se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Estructuras encontradas a la exteriorización del aparato reproductor, así como de las estructuras identificadas al momento de la colección.

Variable*	Grupos			
	n	Testigo media ± e.e.	n	Tratado FGA media ± e.e.
CLN	17	10.7 ± 1.95 a	18	4.2 ± 2.08 b
CLR	17	3.6 ± 1.56 a	16	8.5 ± 1.66 b
CLT	17	14.3 ± 1.79 a	16	12.0 ± 1.42 a
FOLT	9	5.8 ± 1.81 a	10	5.8 ± 1.72 a
ESTO	18	7.6 ± 1.60 a	19	6.9 ± 1.56 a
OVO	18	1.2 ± 0.70 a	19	1.7 ± 0.68 a
EMT	18	6.0 ± 1.56 a	19	4.7 ± 1.52 a
EMNT	18	0.3 ± 0.16 a	19	0.4 ± 0.15 a

CLT = cuerpos lúteos totales; CLN = cuerpos lúteos normales; CLR = cuerpos lúteos en regresión; FOLT = folículos totales; ESTO = Estructuras totales obtenidas al lavado uterino; OVO = ovocitos; EMT = embriones transferibles; EMNT = embriones no transferibles.

a,b valores que comparten la misma literal (renglón) no son estadísticamente diferentes ($p > .05$)

El total de ovulaciones, representadas por el número de cuerpos lúteos presentes (CLT) en los ovarios tuvo un promedio de 14.3 ± 1.79 cuerpos totales para el grupo testigo y un 12.0 ± 1.42 para el grupo tratado, sin existir diferencia significativa entre los grupos ($P > .05$).

En los animales del grupo testigo se obtuvo un promedio de 10.7 ± 1.95 cuerpos lúteos normales (CLN) y para el grupo tratado 4.2 ± 2.08 existiendo diferencia significativa a favor del testigo ($P < .05$). Al considerar los cuerpos lúteos en regresión (CLR), el testigo tuvo un promedio de 3.6 ± 1.56 y el grupo tratado de

8.5 ± 1.66 existiendo diferencia estadísticamente significativa a favor del grupo tratado (P> .05).

En cuanto a la cantidad de folículos (FOLT) presentes en los ovarios, solo se tuvo registro confiable de 19 animales, 9 para el grupo testigo y 10 para el tratado. El grupo testigo tuvo una media de 5.8 ± 1.81 folículos y el grupo tratado 5.8 ± 1.72 sin que hubiera diferencia significativa (P> .05).

En el grupo testigo, del total de animales a los que se les lavaron los cuernos uterinos, se pudo recolectar alguna estructura en el 88.8% y para el grupo tratado en el 84.2% (P> .05)

Como resultado del lavado uterino se obtuvo un promedio de 7.6 ± 1.60 estructuras totales (ESTO) para el grupo testigo y 6.9 ± 1.56 estructuras para los animales tratados, no existiendo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (P> .05).

Cuando las estructuras totales se dividieron en ovocitos, embriones transferibles y embriones no transferibles, se obtuvieron los siguientes promedios: En el grupo testigo, los ovocitos (OVO) promediaron 1.2 ± 0.70 y en el grupo tratado 1.7 ± 0.68. Para embriones transferibles (EMT), el grupo testigo tuvo un promedio de 6.0 ± 1.5 y el grupo tratado 4.7 ± 1.5, en cuanto a embriones no transferibles (EMNT) el promedio fue de 0.3 ± 0.16 para el grupo testigo y 0.4 ± 0.15 para el tratado. En ninguna de las tres comparaciones anteriores existieron diferencias estadísticas significativas (P> .05).

El análisis de varianza que consideró el efecto de tratamiento sobre los animales que solo presentaron falla lútea, (Cuadro 3) mostró lo siguiente: Una diferencia estadísticamente significativa (P< .05) para estructuras totales (ESTO), con un promedio de 1.3 ± 1.32 en el grupo testigo, contra 6.3 ± 0.83 para los animales que pertenecieron al grupo tratado . El mismo comportamiento se observó para embriones transferibles (EMT), donde el grupo testigo tuvo un promedio de 1.16 ± 1.35 en comparación con 4.5 ± 0.85 para los animales tratados. Con respecto a

ovocitos (OVO) y embriones no transferibles (EMNT) en este análisis no existió diferencia significativa entre los grupos ($P > .05$).

Cuadro 3. Promedios de estructuras totales (ESTO), embriones transferibles (EMT) y embriones no transferibles (EMNT) por grupo, considerando únicamente animales con falla lútea temprana.

	Testigo media \pm e.e.	Tratado media \pm e.e.
ESTO	1.31 \pm 1.3 a	6.3 \pm 0.8 b
EMT	1.16 \pm 1.3 a	4.5 \pm 0.8 b
EMNT	0.0 \pm 0.2 a	0.2 \pm 0.1 a

a,b valores que comparten la misma literal (renglón) no son estadísticamente diferentes ($p > .05$)

Niveles de Progesterona.

Los promedios en las concentraciones plasmáticas de progesterona observados en ambos grupos hasta la colección embrionaria, son mostrados de acuerdo al día y número de muestreo en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Niveles de progesterona en cabras superovuladas del día 1 y hasta la colección.

Día	Muestreo	Grupos			
		n	Testigo media ± e.e.	n	Tratado media ± e.e.
1	1	18	0.0 ± 0.0 a	19	0.0 ± 0.0 a
	2	18	0.0 ± 0.0 a	18	0.0 ± 0.0 a
2	3	18	0.3 ± 0.0 a	19	0.3 ± 0.0 a
	4	18	0.8 ± 0.2 a	19	0.9 ± 0.2 a
3	5	18	3.1 ± 0.6 a	19	3.5 ± 0.6 a
	6	18	4.4 ± 0.8 a	19	4.7 ± 0.7 a
4	7	18	7.3 ± 0.9 a	19	5.4 ± 0.9 a
	8	18	5.8 ± 0.9 a	19	5.8 ± 0.9 a
5	9	18	6.4 ± 1.4 a	19	4.9 ± 1.3 a
	10	17	7.5 ± 1.4 a	19	3.1 ± 1.4 b
6	11	18	8.0 ± 1.5 a	19	2.8 ± 1.5 b
	12	17	8.6 ± 1.7 a	19	2.9 ± 1.6 b
7	13	17	8.2 ± 1.6 a	19	2.8 ± 1.5 b

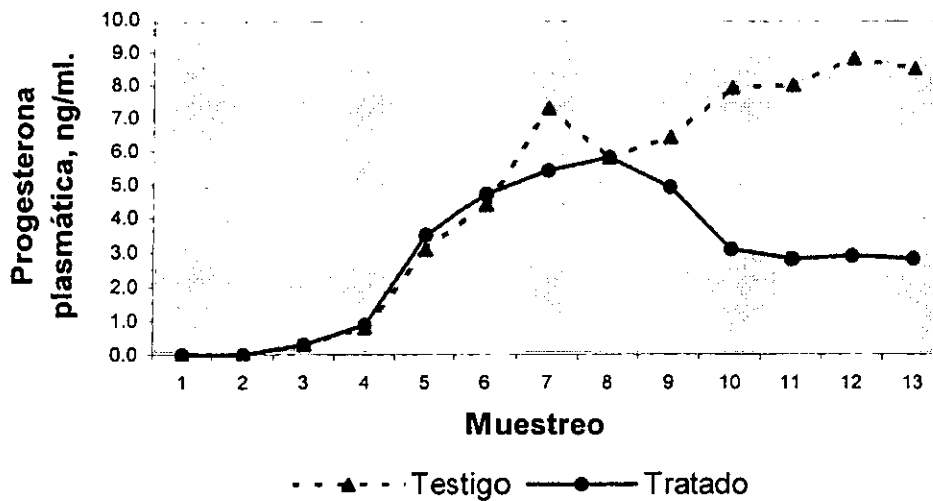
a,b valores que comparten la misma literal (renglón) no son estadísticamente diferentes ($P > .05$)

De los trece muestreos de plasma sanguíneo que se realizaron para la determinación de progesterona, no existió diferencia estadísticamente significativa entre los grupos durante los primeros nueve muestreos ($P > .05$); a partir del décimo y hasta el treceavo si existió diferencia significativa ($P < .05$), todas a favor del grupo testigo. Se encontró que los niveles de progesterona disminuyeron drásticamente en el grupo tratado a partir del décimo muestreo, manteniendo este comportamiento hasta el último muestreo previo a la colección embrionaria.

Lo anterior mostró que los niveles de progesterona decrecen en forma notable hacia el final del quinto día en el grupo tratado (muestra 9) (Gráfica 1). Al mismo tiempo se observó en ambos grupos que durante el primero y segundo muestreo no se detectaron niveles de progesterona, para el tercero y cuarto muestreo la progesterona tuvo un incremento sin rebasar la marca de un nanogramo por

mililitro en promedio. Para el muestreo matutino del tercer día (quinto muestreo) los niveles de progesterona se habían elevado, manteniéndose esta tendencia durante el resto de los muestreos para el grupo testigo y hasta el octavo muestreo en el grupo tratado, notándose el inicio en la disminución de los niveles promedio de progesterona como se había mencionado a partir del noveno muestreo.

Gráfica1. Niveles de progesterona promedio en ambos grupos.



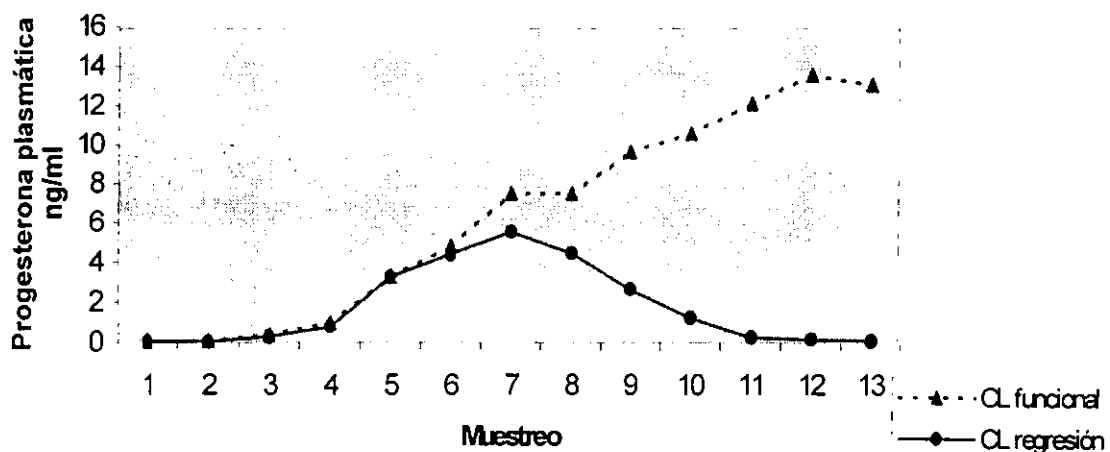
Al comparar en ambos grupos los niveles de progesterona con el tipo de cuerpo lúteo observado macroscópicamente, en la totalidad de los animales con cuerpos lúteos en regresión se confirmó la luteólisis con la disminución en los niveles de progesterona. Para aquellos en los que el cuerpo lúteo se clasificó como normal, en la mayoría de los animales se observó una tendencia ascendente en el perfil de progesterona, solamente en un animal no coincidió lo observado con los niveles de progesterona que marcaron la regresión del cuerpo lúteo. Los animales que mostraron ambas clasificaciones a la vez (mixtos), el 57.1% tuvo niveles descendentes de progesterona y el restante los mantuvo hasta el día de la colección. (Cuadro 5)

Cuadro 5. Relación entre la clasificación macroscópica de los cuerpos lúteos (renglón superior), y los niveles plasmáticos de progesterona (columna izquierda)

	Cuerpos lúteos normales	Cuerpos lúteos regresión	Cuerpos lúteos mixtos
Niveles ascendentes de progesterona	92.9%	0.0%	42.9%
Niveles descendentes de progesterona	7.1%	100%	57.1%

En la gráfica 2 se aprecian los valores promedio de progesterona en los animales que tuvieron regresión lútea y en los animales con cuerpo lúteo funcional sin considerar el grupo al que pertenecían.

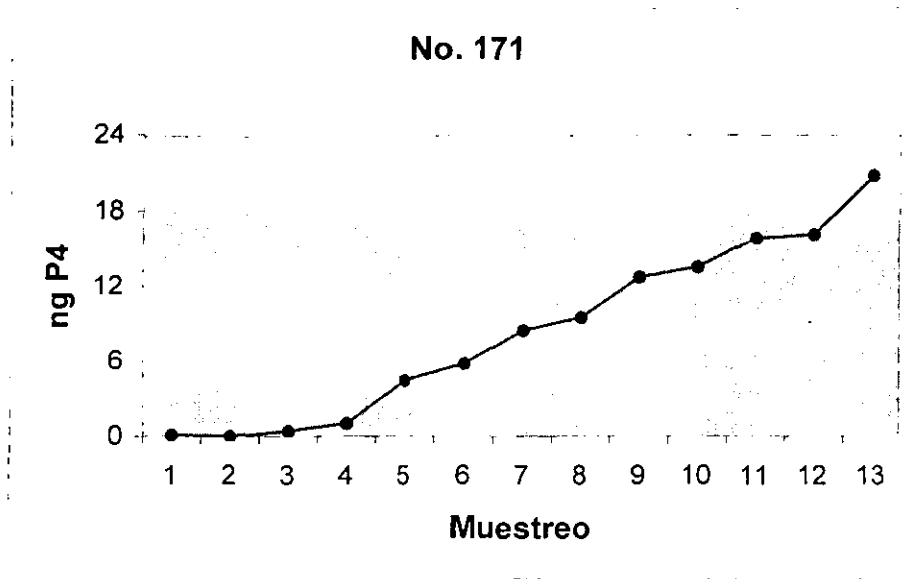
Gráfica 2 Niveles de progesterona promedio en cabras con cuerpo lúteo funcional y en regresión sin considerar grupo.



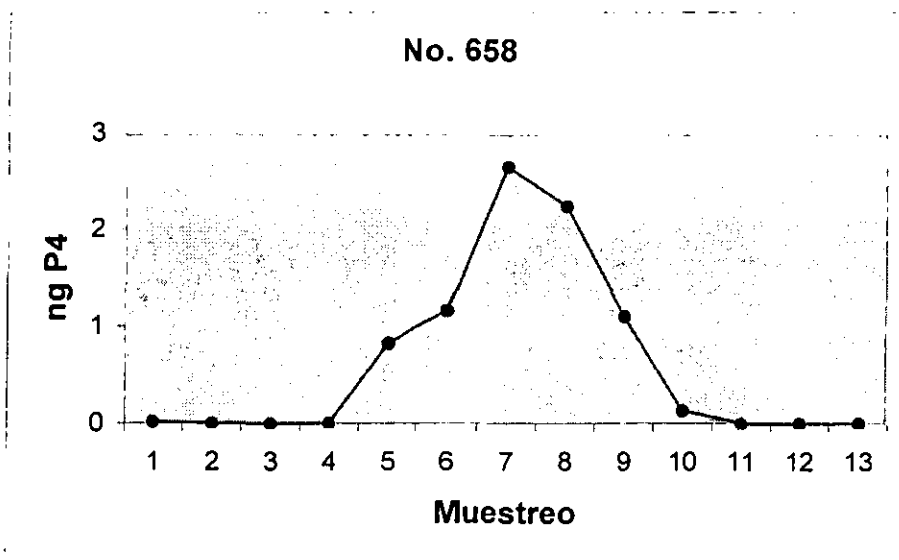
Con la finalidad de apreciar el comportamiento individual en los niveles de progesterona a lo largo del muestreo, la Gráfica 3 muestra el perfil de progesterona plasmática de una cabra superovulada con cuerpos lúteos normales, así mismo la Gráfica 4 los muestra para una cabra con cuerpos lúteos en

regresión, la Gráfica 5 para un animal con cuerpos lúteos mixtos con perfil normal de progesterona y por último la Gráfica 6 un animal también con cuerpos lúteos mixtos pero con un perfil anormal de progesterona.

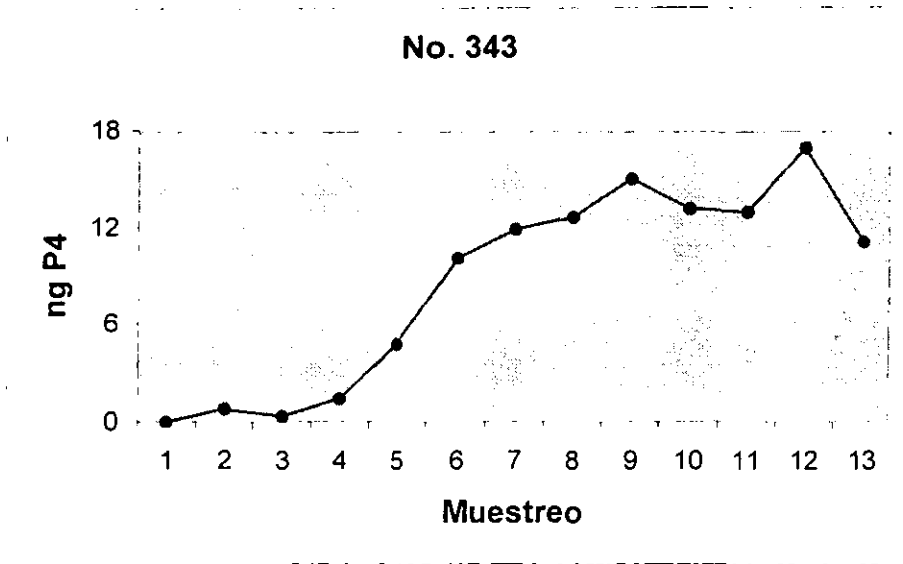
Gráfica 3. Niveles de progesterona en una cabra con cuerpos lúteos normales.



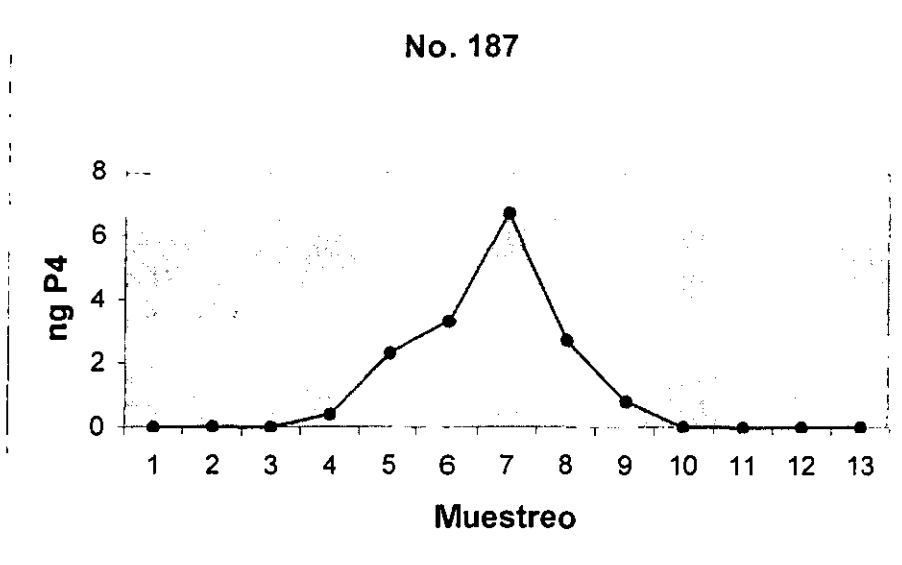
Gráfica 4. Niveles de progesterona en una cabra con cuerpos lúteos en regresión.



Gráfica.5. Niveles de progesterona ascendentes en una cabra con cuerpos lúteos mixtos



Gráfica 6. Niveles de progesterona descendentes en una cabra con cuerpos lúteos mixtos.



El análisis de correlación entre los muestreos de progesterona 12° y 13° con respecto a las estructuras totales (ESTO), embriones transferibles (EMT) y embriones no transferibles (EMNT) considerando el tratamiento (Cuadro 6), demostró que en el grupo testigo existe una correlación positiva entre los niveles de progesterona al 12° muestreo y las estructuras totales ($r: 0.7614$, $P: 0.0002$) y de igual forma con los embriones transferibles ($r: 0.6556$, $P: 0.0031$). Los niveles de progesterona al 13° muestreo también tuvieron correlación positiva con las variables anteriores ($r: 0.6653$, $P: 0.0026$ y $r: 0.5014$, $P: 0.0340$ respectivamente). En el grupo tratado no hubo correlaciones significativas entre los niveles de progesterona al 12° y 13° muestreo y los parámetros antes mencionados.

Cuadro 6. Coeficientes de correlación entre niveles de progesterona al 12° y 13° muestreo, con respecto a estructuras totales (ESTO), embriones transferibles (EMT) y embriones no transferibles (EMNT) en el grupo testigo y control.

Grupo Testigo	Progesterona 12° muestreo	Progesterona 13° muestreo
ESTO	$r: 0.76$ (0.0002)	$r: 0.66$ (0.0026)
EMT	$r: 0.65$ (0.0031)	$r: 0.50$ (0.0340)
EMNT	$r: 0.28$ (0.2497)	$r: 0.41$ (0.0888)
Grupo Tratado FGA		
ESTO	$r: 0.24$ (0.3140)	$r: 0.15$ (0.5239)
EMT	$r: -0.11$ (0.6440)	$r: -0.06$ (0.8051)
EMNT	$r: 0.41$ (0.0790)	$r: 0.36$ (0.1284)

Microscopía óptica.

De los 12 animales que fueron destinados para coleccionar muestras de cuerpo lúteo, solamente se coleccionó en 9 de ellos, 5 para el grupo tratado y los 4 restantes para el grupo testigo.

Cuerpo lúteo normal.

En la figura 1 se muestran las poblaciones celulares de los cuerpos lúteos de cabra considerados macroscópicamente como funcionales y teñidos con Hematoxilina-Eosina o con tinción Tricrómica de Masson; en ella se distinguen dos poblaciones de células esteroideogénicas: células lúteas grandes y células lúteas pequeñas. Las células lúteas grandes fueron el grupo celular que predominó a primera vista. Generalmente tuvieron forma poliédrica, con un núcleo redondo que contenía un delgado margen de cromatina en su periferia y un nucleolo prominente (Fig.1a). El citoplasma presentó una apariencia pálida debida a un material homogéneo teñido acidófilamente, el cual posiblemente fuese pigmento luteínico acumulado en las células, además de un gran número de vacuolas ligeramente más densas.

Las células pequeñas, distribuidas entre las células grandes mostraron también un citoplasma de aspecto vacuolado. Los núcleos fueron de forma irregular y teñidos más basófilamente (Fig.1a).

Se observaron capilares sanguíneos entre los cordones o acúmulos de células luteínicas (Fig.1b). En las preparaciones teñidas con tinción tricrómica de Masson se observó una escasa cantidad de tejido conjuntivo entre las células lúteas (Fig.1c).

En algunas muestras se encontraron ocasionalmente algunas células con la cromatina condensada o con un mayor margen de condensación de esta en la periferia del núcleo, aunque se observaron en baja proporción y posiblemente fueron células en estado de apoptosis (Fig.1d).

Cuerpo lúteo en regresión.

En la Figura 2 se presentan las características celulares de los cuerpos lúteos en regresión, donde se observa abundante infiltración de tejido conjuntivo, fibroblastos y una notoria disminución del tamaño celular sobre todo en el de las células grandes cuyo citoplasma presentó vacuolizaciones y cuerpos densos acidófilos (Fig.2a). Tanto en las células pequeñas como en las grandes el núcleo se observó redondo pero con material nuclear condensado. Dentro del abundante tejido conjuntivo se observó material condensado de aspecto basófilo que posiblemente correspondía a cuerpos apoptóticos (Fig.2b). También se distinguieron vesículas acidófilas, probablemente con el producto de secreción compactado. El grado de avance en la condensación del material nuclear fue variable, observándose en el mismo tejido núcleos en diferentes etapas de condensación. En general, el tejido considerado en regresión se observó con una importante infiltración de tejido fibroso que le dio al cuerpo lúteo un aspecto desorganizado del componente celular, el cual mostró disminución en su tamaño y alteraciones citoplásmicas y nucleares, así mismo se observaron cuerpos apoptóticos de aspecto basófilo entre el tejido conjuntivo con tendencia a presentarse en la periferia del tejido lúteo (Fig.2c y 2d). Sin embargo entre las células en degeneración, hubo un número variable de células de aspecto normal consideradas como funcionales.

Observación ultraestructural.

Cuerpo lúteo normal. En los cuerpos lúteos funcionales (Fig 1), las células lúteas grandes se caracterizaron por presentar un núcleo esférico y central con un nucleolo prominente (Fig.1a). Los componentes citoplasmáticos más abundantes fueron en retículo endoplásmico liso (REL) y las mitocondrias (Fig.1b). El REL presentó una apariencia vesicular o de túbulos anastomosados cortos. La morfología de las mitocondrias fue variable, tendiendo a ser redondas u ovals con crestas tubulares y matriz electrodensa. El Aparato de Golgi se localizó en la región perinuclear. Además, las células presentaron vesículas secretoras, lisosomas, gotas de lípidos y escaso retículo endoplásmico rugoso (RER) (Fig.1c).

Por otra parte, las células pequeñas (Fig. 2) se caracterizaron por ser más electrodensas que las células grandes, por presentar el núcleo oval y de contorno irregular con grupos pequeños de heterocromatina adheridos a la membrana nuclear (Fig.2a). El citoplasma en este tipo de células contuvo una gran cantidad de RER, menor cantidad de mitocondrias en relación con las células grandes y un gran número de lípidos sin observarse vesículas de secreción. Además esparcidos entre los dos tipos de células esteroidogénicas pudieron ser observados una gran cantidad de capilares, fibroblastos y fibras de colágeno (Fig.2b). Por otra parte, confirmando las observaciones histológicas, de manera esporádica dentro del tejido de los cuerpos lúteos funcionales se apreciaron células lúteas en apoptosis (datos no mostrados).

Cuerpo lúteo en regresión. En los cuerpos lúteos considerados en regresión, el tejido presentó células luteínicas morfológicamente normales y células luteínicas en regresión. Estas últimas fueron las más abundantes y se identificaron por su incrementada electrodensidad, los contornos celulares irregulares y su fragmentación, además de abundante cantidad de lípidos (Fig.3a y 3b). Numerosos elementos circulares densos y pequeños que contenían masas de restos celulares estuvieron presentes, muchos de ellos ya habían sido digeridos por macrófagos localizados en el tejido conjuntivo (Fig.4a). En general, la ultraestructura de las células luteínicas fue marcadamente variable; esto incluyó agrupamientos electrodensos de mitocondrias o alteraciones en el RE para formar pequeñas vesículas o enrollamientos grandes del REL (lamelas). La condensación del citoplasma fue un rasgo universal, ello dentro de regiones focales de las células lúteas o a menudo como agrupamientos extracelulares de los restos celulares (Fig.5a y 5b). Usando altas magnificaciones de las células lúteas reconocibles o de los fragmentos derivados de ellas, numerosos cuerpos particulados o autofagocíticos fueron vistos en el citoplasma (Fig.6a). Los estados avanzados de regresión se caracterizaron por una atrofia celular general, fragmentación y una gran cantidad de matriz extracelular y fibras de colágeno (Fig.6b). Por otra parte un gran número de células se encontraron en apoptosis,

las cuales se identificaron por la característica condensación y fragmentación del material nuclear en este proceso; además los organelos dentro de vesículas mantuvieron su morfología normal (Fig.7a). En todas las preparaciones observadas no se apreciaron vesículas de secreción como en los cuerpos lúteos normales.

Al comparar la observación directa de los cuerpos lúteos con la microscopía y los niveles de progesterona, todos los animales a excepción de uno coincidieron en la clasificación de cuerpo lúteo normal o en regresión. El único animal con diferencias fue clasificado como normal macroscópicamente, pero tanto la microscopía como los niveles de progesterona indicaron que había regresión lútea.

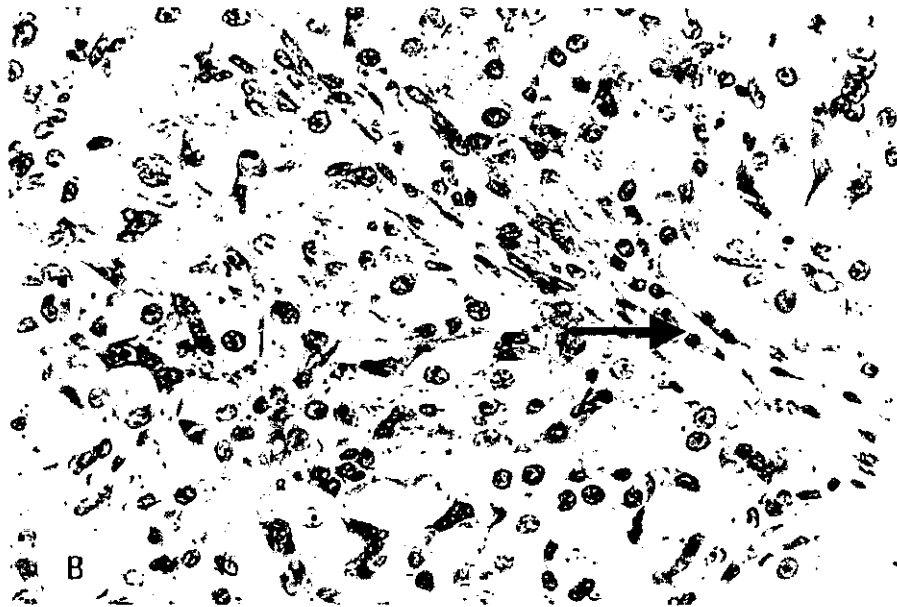
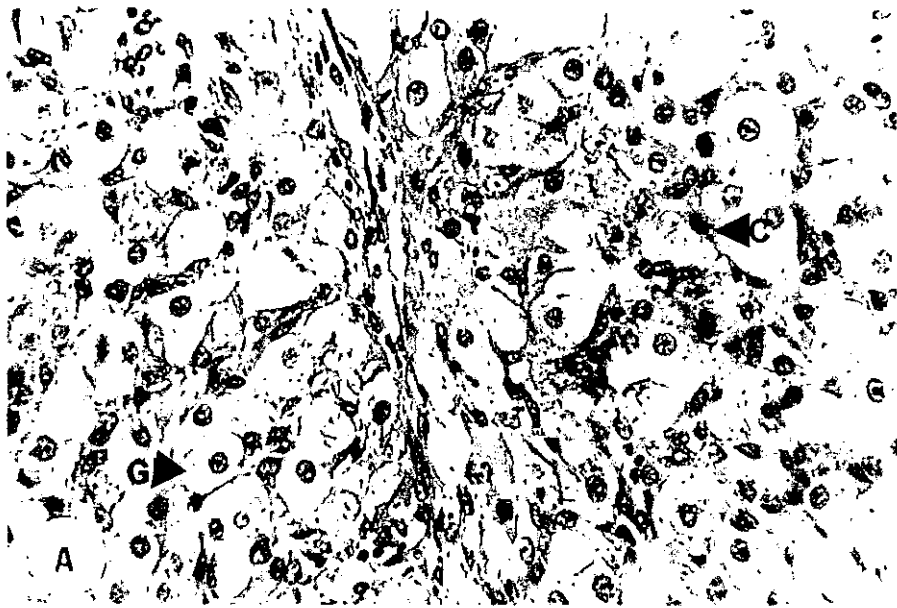
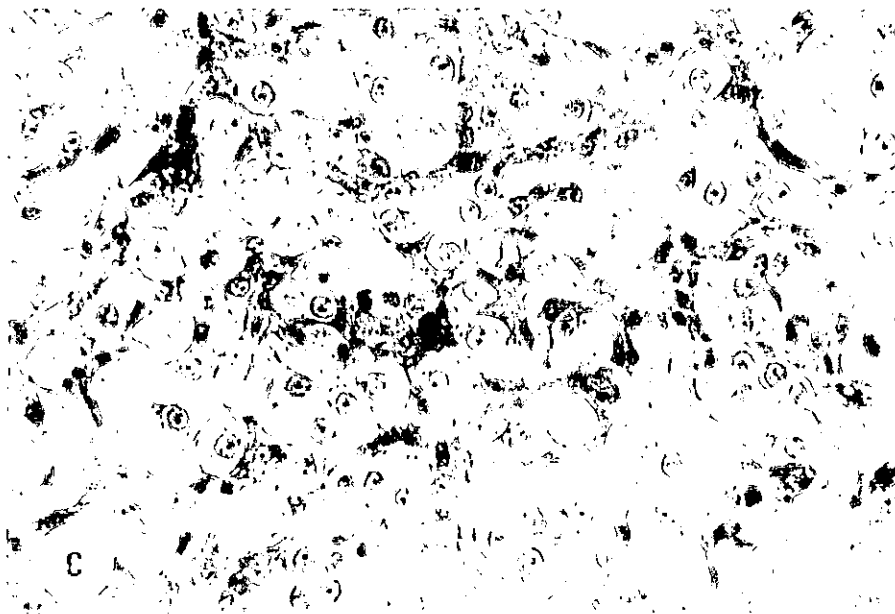
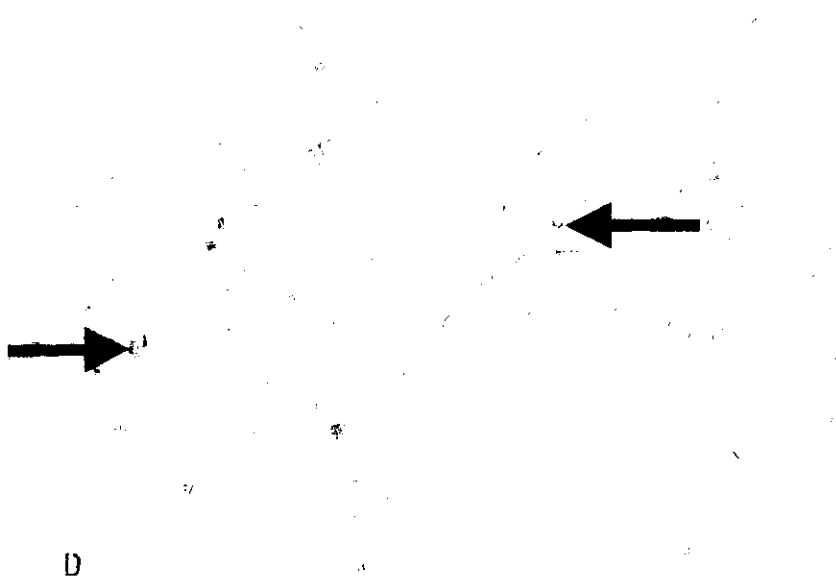


Figura1. Aspecto general del cuerpo lúteo funcional de la cabra. (A) Fotografía del cuerpo lúteo normal teñido con hematoxilina-eosina donde se muestran los tipos celulares predominantes que forman el tejido lúteo: células lúteas grandes (G) y células lúteas chicas (C). (B) Fotografía que muestra la presencia de capilares (flecha) entre las células lúteas. (C) Tinción tricrómica de Masson donde se muestra la tinción de tejido conjuntivo (azul) entre las células del cuerpo lúteo. Como se observa, la cantidad de tejido conjuntivo es escasa. (D) Tinción de hematoxilina-eosina donde se observa la condensación de la cromatina en algunas células (flechas). Escaso número de células presentó condensación de cromatina en la periferia del núcleo y otras presentaron el material nuclear completamente condensado. 400X.



Continuación Figura 1



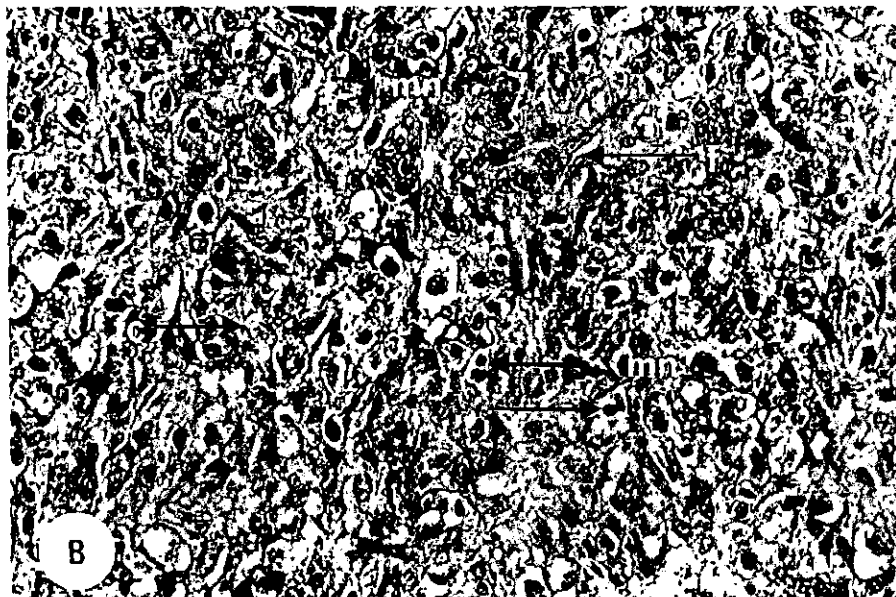
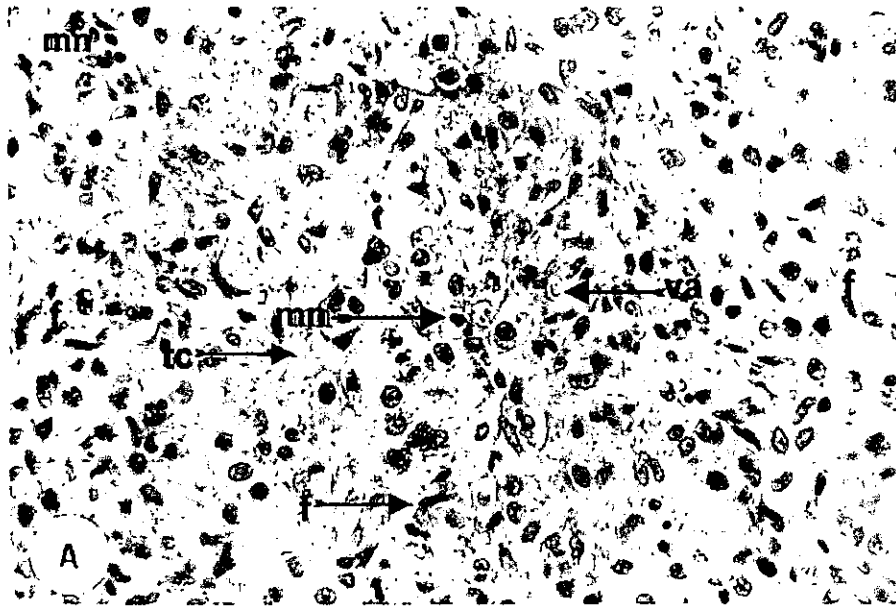
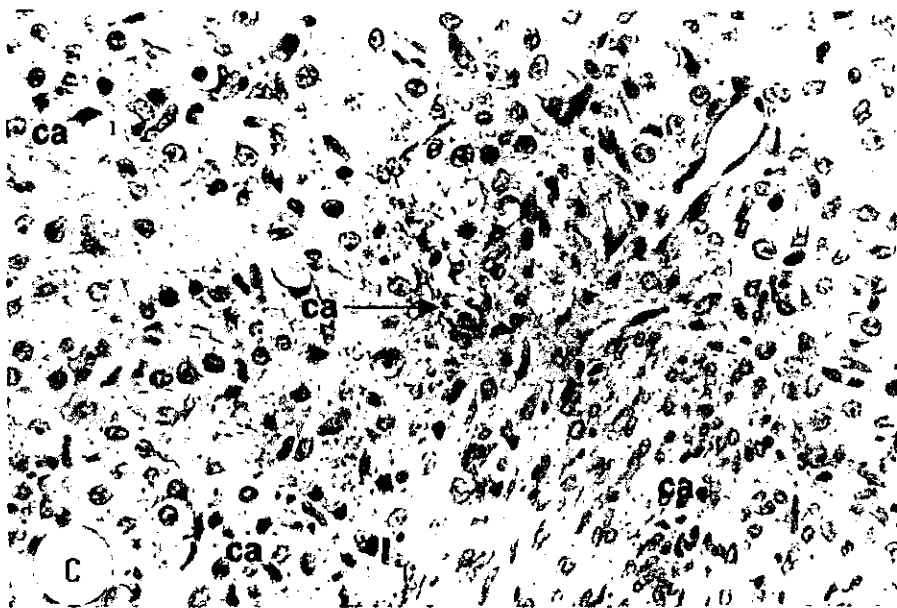
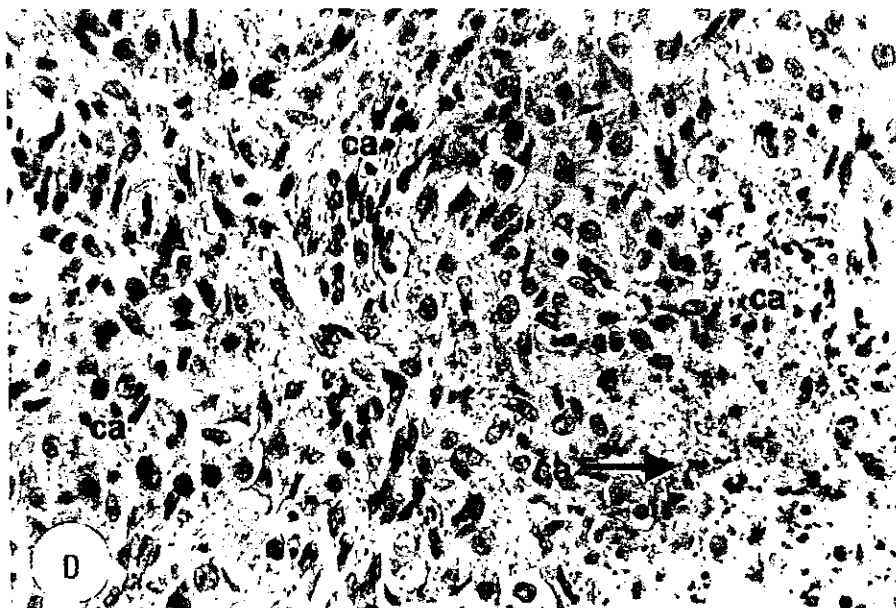


Figura 2. Aspecto general del cuerpo lúteo en regresión de la cabra. (A) Fotografía con tinción de hematoxilina-eosina mostrando la disminución del tamaño celular, así como la infiltración de abundante tejido conjuntivo (tc) y gran número de fibroblastos (f). También se observan células con material nuclear condensado (mn) y vesículas de aspecto acidófilo (va) que probablemente correspondan a la compactación del producto de secreción de las células. (B) Tinción tricrómica de Masson mostrando la abundante infiltración de tejido conjuntivo (tc) y fibroblastos (f). Las células presentan su material nuclear (mn) condensado. (CyD) Fotografías teñidas con hematoxilina-eosina donde se observa fragmentación celular evidenciada por la presencia de cuerpos apoptóticos (ca) de aspecto basófilo. 400X.



Continuación Figura 2



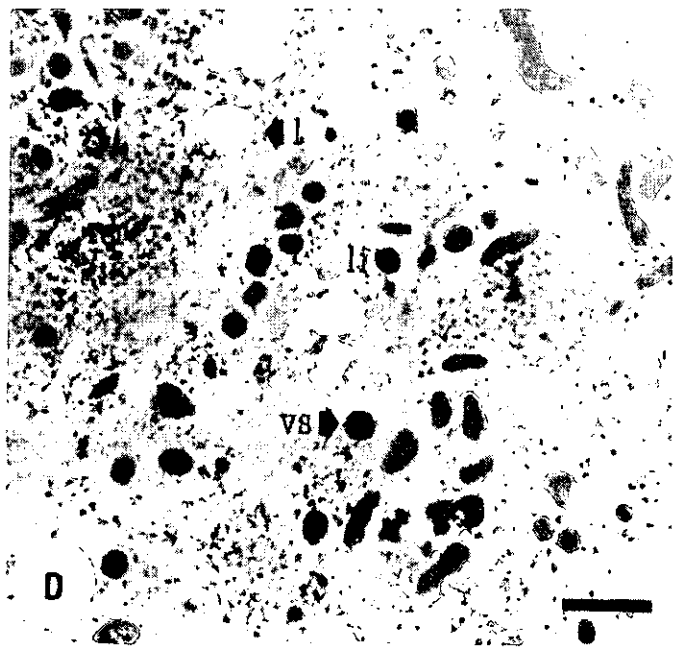
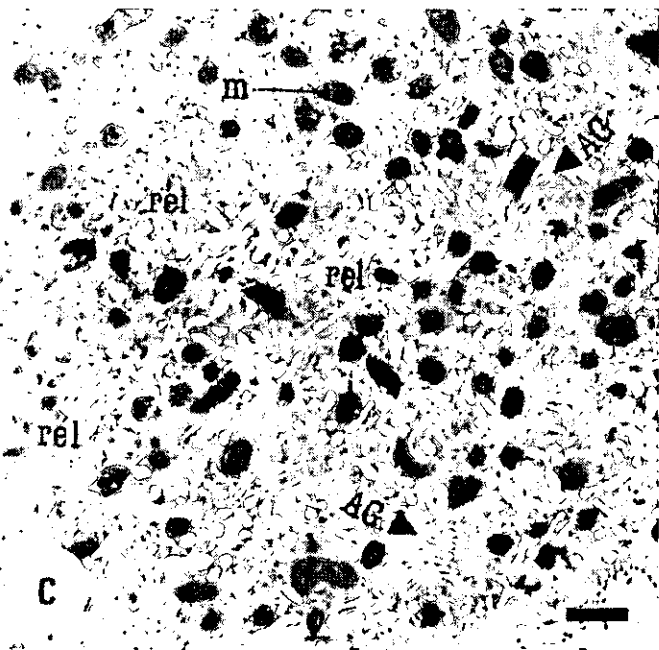
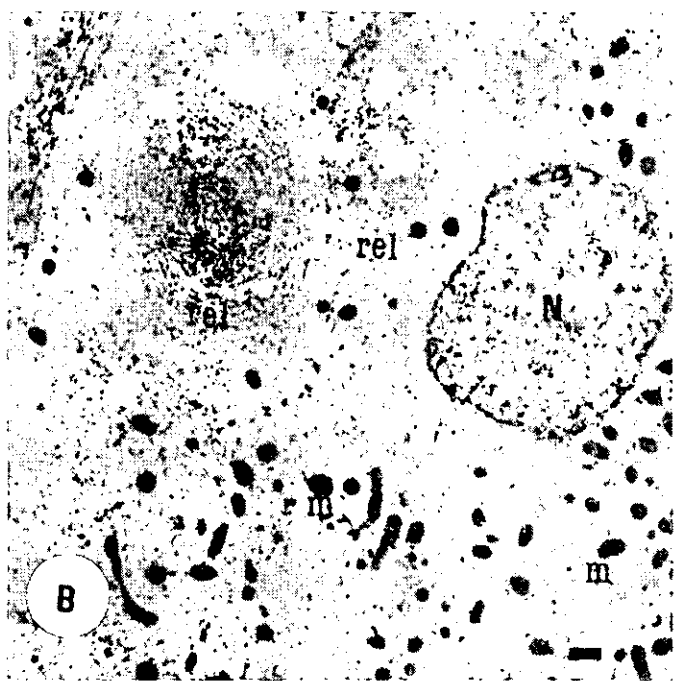
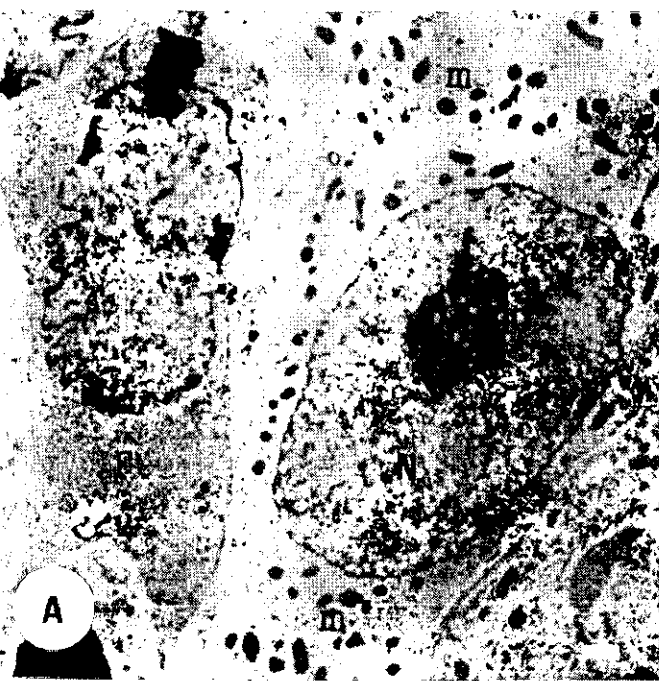


Figura 1. Ultraestructura de las células lúteas grandes de la cabra. (a) Micrografía mostrando el aspecto general de una célula lútea grande, donde se observa un núcleo esférico (N) con su cromatina laxa y un nucleolo prominente (n). También se observan abundantes mitocondrias (m) distribuidas en todo el citoplasma y un fibroblasto (f). (B) Micrografía que muestra la gran cantidad de retículo endoplásmico liso (rel) en las células grandes. Así mismo se observa un gran número de mitocondrias (m). (C) Micrografía a mayor aumento mostrando el retículo endoplásmico liso (rel), aparato de Golgi (AG) y las mitocondrias (m) en el citoplasma de las células grandes. (D) Micrografía que muestra algunas gotas de lípidos (l), retículo endoplásmico rugoso (rer), vesículas de secreción (vs) y lisosomas (li) en la célula lútea grande. Barra = 1 μ .

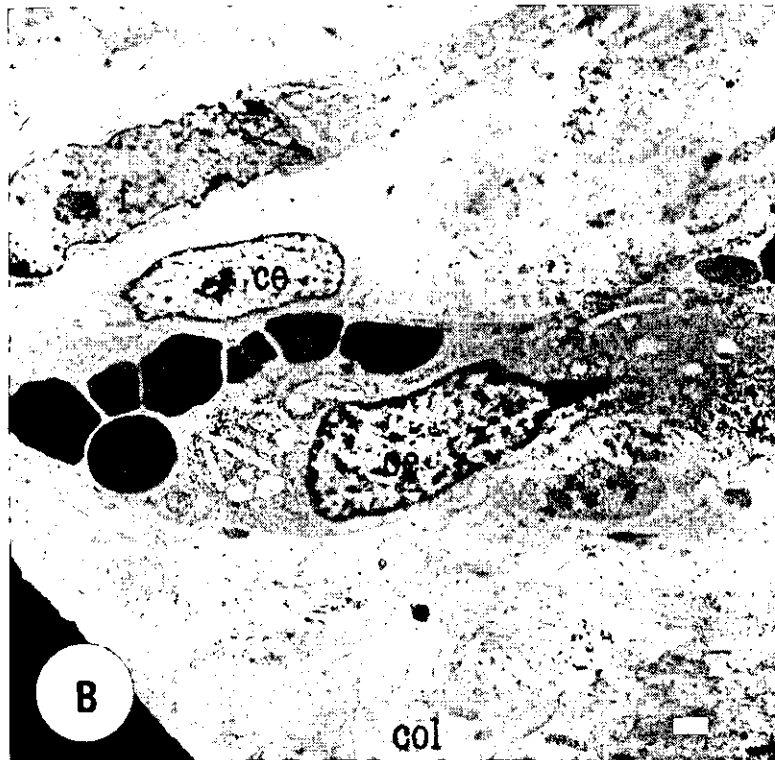


Figura 2. Ultraestructura de las células lúteas chicas de la cabra. (A) El núcleo de las células chicas (N) presentó una cromatina más condensada principalmente en la periferia en comparación con el de las células grandes. En el citoplasma se observa gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso (rer). También se observan escasas mitocondrias (m) y un número reducido de fibras de colágeno (col) entre las células lúteas. (B) Micrografía de un capilar donde se observan varios eritrocitos (e) y células endoteliales (ce). La micrografía también muestra un fibroblasto (f) y fibras de colágeno (col). Barra = 1 μ .

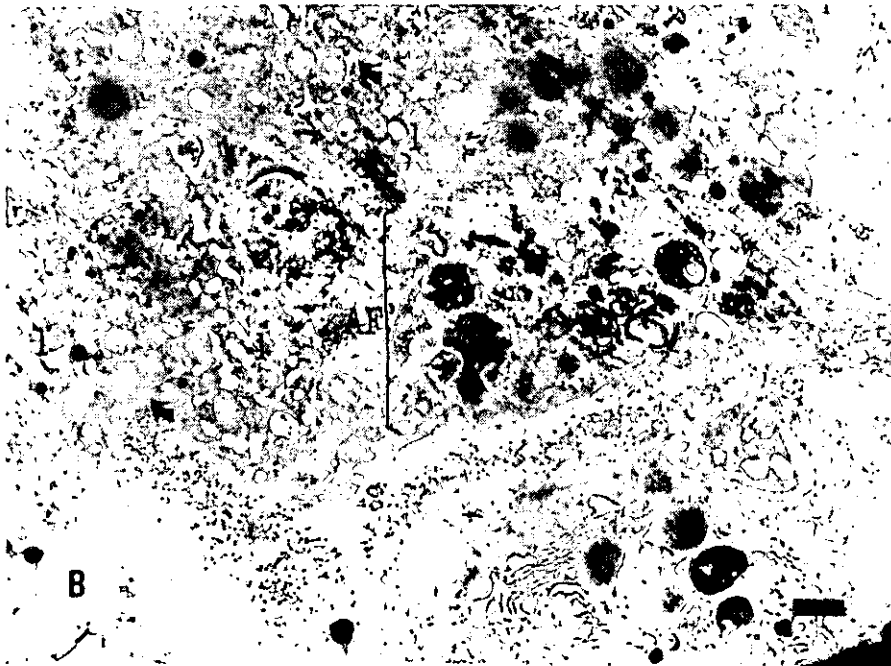
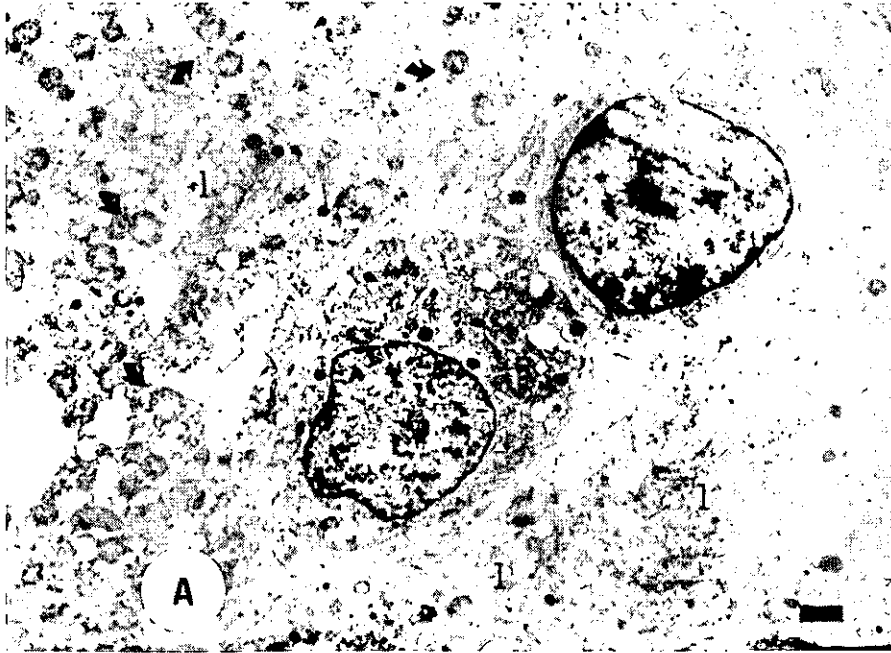


Figura 3. Ultraestructura del cuerpo lúteo en regresión de la cabra. (A) Micrografía mostrando dos células lúteas chicas normales, rodeadas por células en proceso de degeneración. Las mitocondrias de este último tipo de células se observan más electrolúcidas (punta de flecha) y el citoplasma presenta gran cantidad de lípidos (l). (B) Micrografía mostrando vesículas autofagocíticas (AF) las cuales presentan en su interior material electrodensó. Obsérvese el agrupamiento de las mitocondrias (punta de flecha) y la gran cantidad de lípidos (l). Barra = 1 μ .



Figura 4. Micrografía a gran aumento mostrando una vesícula fagocítica dentro de un macrófago.

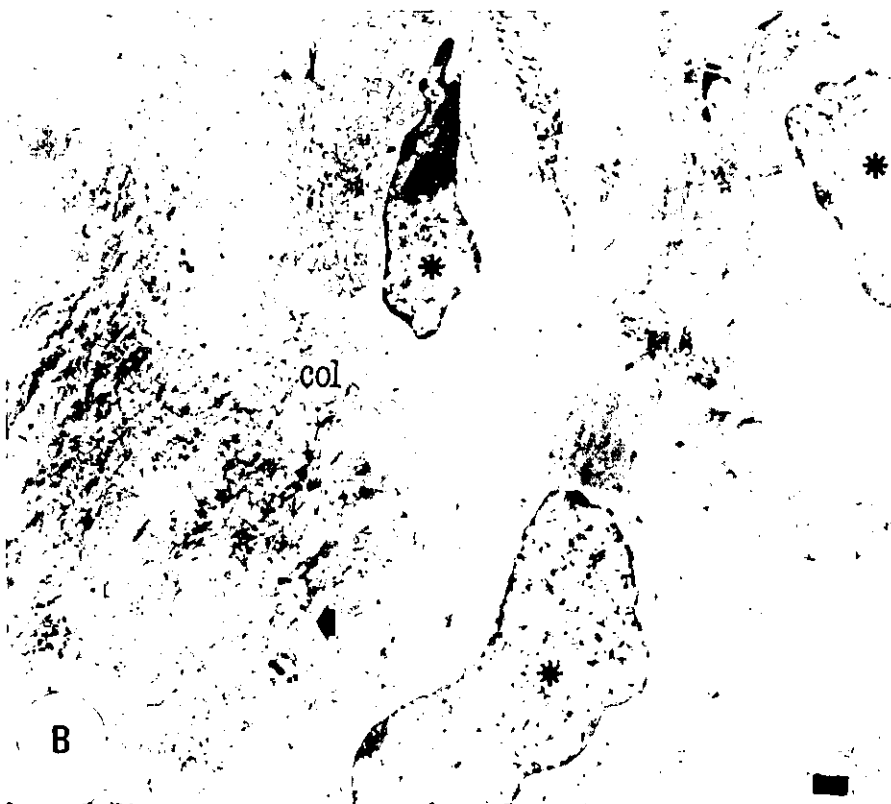
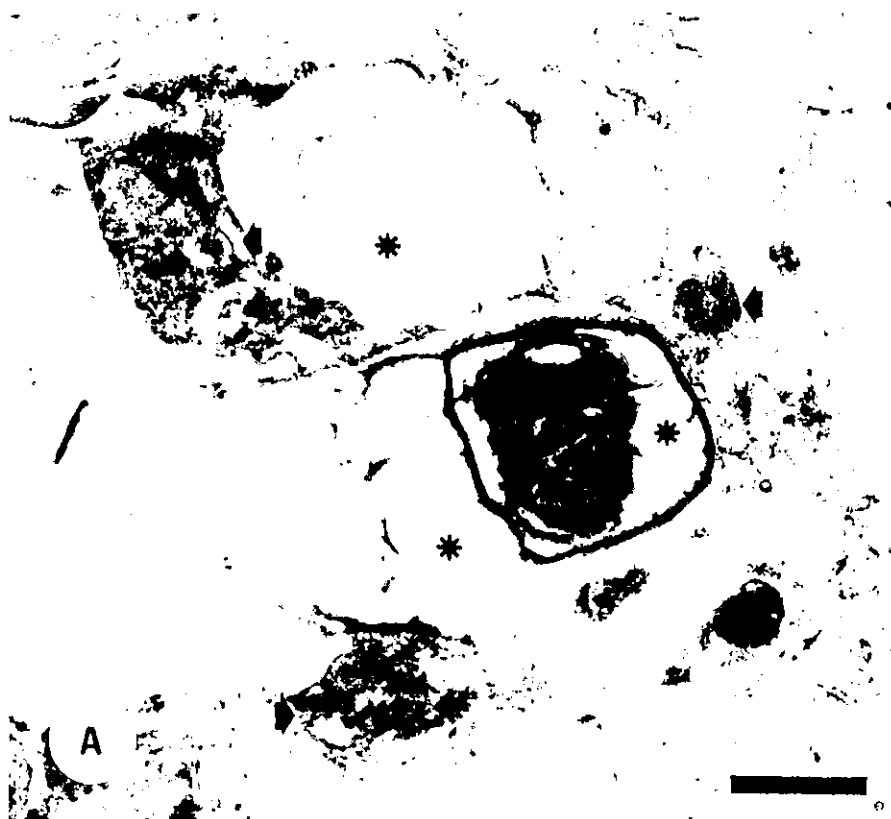


Figura 6. Células lúteas en regresión. (A) Fragmentos celulares conteniendo mitocondrias en degeneración (punta de flecha) y vesículas vacías o con fragmentos de material nuclear (asterisco). (B) Micrografía a menor aumento con células aparentemente normales (asterisco) y entre ellas una gran cantidad de material degenerado (punta de flecha), así como fibras de colágeno (col). Barra = 1 μ .

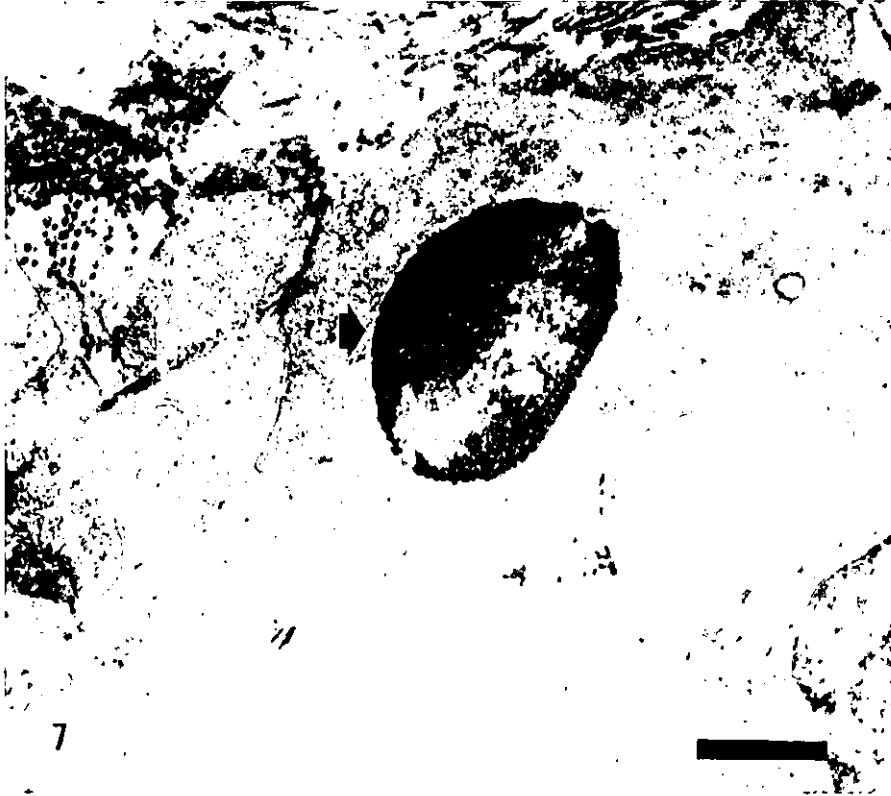


Figura 7. Micrografía mostrando el material nuclear condensado característico de las células en apoptosis (cabeza de flecha). Barra = 1 μ .

V. Discusión.

En este estudio la respuesta a la sincronización de los animales superovulados fue superior a la obtenida por Armstrong *et al.*, (1983b)¹⁵, Armstrong *et al.*, (1983c)¹⁸, Nowshari *et al.*, (1995)⁴ y Pendleton *et al.*, (1992)², pero fue menor a lo obtenido por Senn y Richardson (1992)⁵, quienes lograron hasta un 100% de celos sincronizados.

Al tomar en cuenta las características macroscópicas de los cuerpos lúteos se observó que hubo una diferencia significativa entre grupos para los cuerpos lúteos de aspecto normal ($P < .05$); esta diferencia se mantuvo ($P < .05$) para los cuerpos lúteos en regresión. Los promedios de ambos grupos demuestran que la incidencia de cuerpos lúteos en regresión en el grupo tratado fue mucho mayor que en el grupo testigo.

Al comparar el porcentaje de cuerpos lúteos en regresión en el grupo tratado (63.1%) con otros trabajos, se observa que es superior al 35% obtenido por Pintado *et al.*, (1996)¹¹ y al 27% de Tervit *et al.*, (1986)⁸ ambos habiendo utilizado también FSH porcina, aunque es menor al 87.5% encontrado por Armstrong *et al.*, (1987)²¹ cuando se utiliza eCG para el tratamiento superovulatorio. Sin embargo, no hay que olvidar que este fenómeno ocurre más frecuentemente cuando se utiliza eCG (2,7), por lo que el porcentaje encontrado en el grupo tratado es notoriamente mayor al 22.2% del grupo testigo el cual se aproxima a los valores encontrados por los primeros autores.

Para aquellos animales que mostraron ambos tipos de cuerpo lúteo no existió diferencia significativa entre los grupos, el 26.3% del grupo tratado es similar al 22% observado por Pendleton *et al.*, (1992)², pero el 11.1% del grupo testigo es notoriamente menor a lo obtenido por estos autores, la observación simultánea de ambos tipos de cuerpo lúteo al parecer no es muy frecuente ya que la información al respecto es escasa.

Al realizar la comparación de medias para cuerpos lúteos totales, no existió diferencia significativa entre los grupos (Cuadro 2), siendo ligeramente menores los promedios de ambos grupos, al obtenido por Armstrong *et al.*, (1983a)¹⁴ con 16.1 ± 0.8 ovulaciones; son prácticamente iguales para el caso del grupo testigo

con los resultados de Pendleton *et al.*, (1992)² (14.7 ± 2.5) y muy similar a lo obtenido por Nowshari *et al.*,(1995)⁴ (11.3 ± 1.6) cuando se compara con el grupo tratado. Por último, los promedios obtenidos en ambos grupos son mayores al 8.80 encontrado por Goel y Agrawal (1990)⁷⁰.

Al analizar estos resultados se confirma que existen variaciones en la respuesta aun cuando los tratamientos superovulatorios son muy similares, por otro lado, cuando se han buscado alternativas como la utilización conjunta de FSHp y hCG para mejorar la tasa ovulatoria los resultados han sido igualmente variables, Taneja *et al.*, (1991)⁷¹ obtuvieron 10.33 ± 1.60 ovulaciones siendo superiores los promedios obtenidos en ambos grupos de este estudio. Saharrea (1996)⁷² obtuvo un promedio de 15.05 ± 1.7 cuerpos lúteos totales cuando utilizó eCG en la superovulación y un tratamiento adicional de hCG; en un segundo experimento además de eCG administró GnRH obteniendo un promedio de 11.1 ± 1.6 . El primer caso es similar a lo obtenido en el grupo testigo y en el segundo caso ligeramente menor al grupo tratado. Existen varios estudios (Batt *et al.*, 1993¹⁶, Selgrath *et al.*,1990⁷³, Armstrong *et al.*, 1987²¹, Walker *et al.*, 1986⁷⁴ y Beckers *et al.*, 1990⁷⁵) donde las variaciones en la respuesta ovulatoria se dan incluso cuando se utilizan diferentes gonadotropinas, dosis, frecuencias de aplicación y hormonas complementarias, pero se puede observar que los valores obtenidos en la tasa de ovulación, traducidos como el número de cuerpos lúteos totales está dentro de la gran variabilidad en la respuesta.

Con respecto a los cuerpos lúteos en regresión y a los cuerpos lúteos de aspecto normal, se observó en el caso de los primeros el valor más alto para el grupo tratado (8.5 ± 1.66) y el menor para el grupo testigo (3.6 ± 1.56). Los cuerpos lúteos normales obtuvieron el valor más alto para el grupo testigo (10.7 ± 1.95) y el menor para el grupo tratado (4.2 ± 2.08).

Al analizar nuevamente el trabajo de Pendleton *et al.*, (1992)², ellos obtuvieron un promedio de 12.7 ± 2.6 de cuerpos lúteos normales y un 2.0 ± 1.6 en regresión. En este estudio el grupo testigo se comportó de manera similar a lo encontrado por estos autores, sin embargo, el grupo tratado tuvo promedios elevados de cuerpos lúteos en regresión, con una tendencia similar a los trabajos donde se utiliza eCG.

Es importante resaltar que los tratamientos superovulatorios, así como el manejo en ambos grupos fueron idénticos, lo que confirma nuevamente que la variabilidad individual en la respuesta es un aspecto que se debe tomar en cuenta.

La cantidad promedio de folículos entre los grupos no tuvo diferencia significativa, tanto el valor para el grupo testigo (5.8 ± 1.8) como para el grupo tratado (5.8 ± 1.7) fueron menores al promedio obtenido por Krisher *et al.*, (1994)⁷⁶ donde utilizaron FSH para el tratamiento superovulatorio (22.1 ± 3.2), quienes además tuvieron un grupo en el que adicionaron GnRH con el fin de sincronizar la ovulación y obtuvieron un promedio de 10.9 ± 2.9 folículos. Nowshari *et al.*, (1995)⁴ trabajando 3 grupos de animales con diferentes porcentajes de LH en la preparación de FSH-p obtuvieron valores promedio de entre 0.7 y 0.8 folículos. En este aspecto nuevamente se obtienen valores extremos sin una explicación clara.

Del total de animales en los que se realizó el lavado uterino no existió diferencia significativa ($P > .05$) entre grupos en los porcentajes de cabras en las que se pudo recuperar alguna estructura (88.8% grupo control y 84.2% grupo tratado). En el caso de la cabra, Armstrong *et al.*, (1987)²¹ indican que la recuperación embrionaria en animales lavados al día 6 ó 7 excede el 75% en aquellos animales que mantienen el cuerpo lúteo, mientras que para aquellos con regresión prematura esta por debajo del 25%. Los porcentajes encontrados en ambos grupos están por arriba del porcentaje considerado por estos autores cuando el cuerpo lúteo se mantiene funcional.

El promedio de estructuras totales para ambos grupos (Cuadro 2) no tuvo diferencias significativas ($P > .05$) sin embargo los valores promedio obtenidos en los dos grupos son inferiores al 13.3 ± 0.7 de Armstrong *et al.*, (1982)¹³ cuando el lavado se realizó entre los 2-4 días posteriores al estro y al 13.6 ± 8.3 de Selgrath *et al.*, (1990)⁷³ quienes utilizaron 20 mg de FSH-p en el tratamiento superovulatorio ni al 10.17 ± 1.27 de Taneja *et al.*, (1991)⁷¹ que realizaron la colección del oviducto a las 45 horas después de finalizado el celo. Por otro lado, los promedios obtenidos son ligeramente menores al promedio de 8.1 ± 1.9 encontrado por Nowshari *et al.*, (1995)⁴ lavando entre el día 5-6 posterior al estro y muy similares al 7.0 de Goel y Agrawal (1990)⁷⁰ y al 7.3 ± 5.0 de Selgrath *et al.*,

(1990)⁷³, cuando el lavado se realizó entre 72-79 horas después de interrumpir el tratamiento con un progestágeno y de haber utilizado 24 mg de FSH-p para superovular.

Pintado *et al.*, (1996)¹¹ señalaron que en cabras con regresión lútea prematura, el promedio de estructuras recuperadas fue de 1.2 ± 0.6 , mientras que en cabras con cuerpo lúteo de aspecto normal fue de 8.9 ± 0.9 cuando el lavado se realizó al día 6. Los promedios obtenidos en ambos grupos de este estudio son menores al encontrado por estos autores cuando se observaron cuerpos lúteos funcionales; sin embargo, los dos grupos tienen promedios muy superiores al señalado para cuerpos lúteos en regresión. Cuando se consideró el efecto del tratamiento únicamente en los animales con falla lútea, el promedio encontrado por estos mismos autores en animales con regresión lútea es muy similar al encontrado en el grupo testigo (1.3 ± 1.32), pero este valor de referencia es muy inferior al observado en el grupo tratado en animales con regresión lútea (6.3 ± 0.83). Armstrong *et al.*, (1982)¹³ mencionan que la tasa de recuperación se incrementa cuando el lavado se realiza entre el día 2 y el día 4; los mismos Armstrong *et al.*, (1983)¹⁸ encontraron tasas bajas de recuperación cuando el lavado se realizó entre el día 6-8; Taneja *et al.*, (1991)⁷¹ mencionan que conforme pasa más tiempo a la colección, la recuperación embrionaria es menor. Sin embargo es importante la comparación de los resultados obtenidos, con los de Selgrath *et al.*, (1990)⁷³ (7.3 ± 5.0 estructuras) quienes utilizaron 24 mg de FSH-p y realizaron el lavado entre las 72 y 79 horas de discontinuado el tratamiento sincronizador, aún cuando existe una diferencia aproximada de 3 días a la colección.

Con respecto a embriones transferibles, en un trabajo realizado por Armstrong y Evans (1983)¹⁴, donde compararon la utilización de 18 mg de FSH-p divididos en varias aplicaciones, con una sola dosis de entre 750-1000 U.I. de eCG, el 94.9% de las cabras programadas como donadoras dieron embriones transferibles mientras que en este estudio fue en el 77.7% de las cabras del grupo testigo, disminuyendo al 73.6% en el grupo tratado. Aunque ambos valores son menores, es importante resaltar el porcentaje obtenido en el grupo tratado, en especial dado que un alto porcentaje de estos animales mostró cuerpos lúteos en regresión.

No existió diferencia significativa ($P > .05$) para los promedios de embriones transferibles de ambos grupos (Cuadro 2). Al comparar los promedios obtenidos con los resultados de Taneja *et al.*, (1991)⁷¹ quienes encontraron un promedio de 9.83 ± 1.08 embriones transferibles colectando a las 45 horas posteriores al estro, se observa una diferencia notable. Sin embargo al compararlos con lo encontrado por Nowshari *et al.*, (1995)⁴ (6.6 ± 1.9) lavando entre el día 5 y 6, son muy similares a los promedios del grupo testigo y ligeramente mayores a los del grupo tratado; un comportamiento parecido se encontró con los resultados de varios autores: Pendleton *et al.*, (1992)² lavando entre el día 5 y 7 posterior al estro obtuvo un 6.7 ± 1.5 de embriones transferibles. Batt *et al.*, (1993)¹⁶ encontraron promedios de 6.2 y 7.4 en dos grupos tratados con 16 mg FSHp realizando la colección entre 4 y 9 días posteriores al estro y por último Goel y Agrawal (1990)⁷⁰ utilizando también FSHp obtuvieron un promedio de 5.11 embriones transferibles.

Pintado *et al.*, (1996)¹¹ obtuvieron una recuperación de embriones transferibles promedio de 0.5 ± 0.4 en cabras con regresión lútea prematura, mientras que para aquellas con cuerpo lúteo de aspecto normal obtuvieron un promedio de 5.5 ± 0.9 realizando el lavado al día 6. Al comparar los resultados de estos autores con los del grupo testigo, este tuvo un promedio ligeramente mayor al del grupo con cuerpos lúteos funcionales, mientras que para los animales tratados con esponja vaginal el promedio fue ligeramente menor al obtenido en el grupo con cuerpos lúteos funcionales y muy superior al grupo con cuerpos lúteos en regresión.

En forma general se puede observar que los promedios obtenidos para embriones transferibles no son muy diferentes de los encontrados por otros autores en ambos grupos. Aun cuando la presentación de cuerpos lúteos en regresión fue notable en el grupo tratado, al analizar los resultados que pudieran verse afectados por la presencia de estas estructuras, se observa que tanto la cantidad de estructuras totales como los embriones transferibles recuperados no tuvieron diferencia significativa ($P > .05$) entre los grupos. La razón por la cual se hace énfasis al trabajo de Pintado *et al.*, (1996)¹¹ es debido a que ellos comparan los resultados obtenidos en animales con cuerpo lúteo normal y cuerpo lúteo en regresión y ya que el grupo tratado tuvo un alto porcentaje de animales con cuerpos lúteos en

regresión (63.1%) y animales en los que los ovarios presentaran cuerpos lúteos mixtos (26.3%), es decir tanto normales como de regresión se considera que los valores obtenidos no fueron deprimidos severamente por esta condición, ya que en el 90.9% de los animales con cuerpo lúteo en regresión se recuperó alguna estructura. Nuevamente considerando el análisis donde se evaluó el efecto del tratamiento sobre los animales con falla lútea, se observa que el grupo tratado con FGA tuvo un promedio de 4.5 ± 0.85 embriones transferibles, superior al encontrado por Pintado *et al* (1996)¹¹ cuando hay regresión lútea y muy similar al promedio de los animales con cuerpo lúteo de aspecto normal.

Battye *et al.*, (1988)²⁶ mencionan que la regresión lútea temprana resulta en bajas tasas de recuperación embrionaria. Citando nuevamente a Armstrong *et al.*, (1987)²¹ ellos mencionan que en aquellos animales con regresión prematura la recuperación embrionaria está por debajo del 25%. Schiewe *et al.*, (1991)⁷⁷ trabajando con ovejas determinaron que cuando estas presentan regresión lútea prematura, no es posible recuperar embriones. Todo lo anterior es apoyado por Pintado *et al.*, (1996)¹¹ quienes precisan que la regresión prematura hace que los resultados sean más variables.

Los niveles de progesterona son indicativos de la actividad del cuerpo lúteo. Al observar los valores promedio de progesterona a lo largo del muestreo (Cuadro 3), se observa que los niveles progesterona alcanzan valores altos en un corto lapso, lo que contrasta con lo observado por Pathiraja *et al.*, (1991)⁷⁸ en cabras no superovuladas, donde el tiempo promedio que tardó la progesterona en elevarse de niveles basales a más de 2ng/ml fue de 5.48 días, incrementándose el tiempo para cabras con ovulaciones simples y evidenciando que aquellas con ovulaciones dobles o triples tiene valores totales más altos que las de ovulación simple.

McClellan *et al.*, (1975)⁷⁹ y Sharma *et al.*, (1993)⁸⁰ encontraron que los niveles de progesterona son consistentemente mayores en borregas superovuladas, coincidiendo los resultados de este estudio con ambos autores.

Ryot *et al.*, (1992)⁸¹ mencionan que los niveles de progesterona plasmática son indicativos de la actividad del cuerpo lúteo, por lo que estos autores proponen que su estimación, puede ayudar a la detección de la respuesta superovulatoria.

Cuando se compara el grupo testigo y el grupo tratado se observa que existen diferencias significativas en los niveles de progesterona a partir del décimo muestreo que corresponde al muestreo vespertino del quinto día (día 0 = día del celo), las diferencias se mantuvieron hasta el día de la colección (día 6 ó 7) marcando una tendencia descendente en los niveles de progesterona para el grupo tratado que se relaciona con el alto porcentaje de animales con regresión lútea prematura. Price (1995)⁹, menciona que la falla lútea se refleja en los niveles de progesterona plasmática, donde después de un incremento inicial que coincide con la formación del cuerpo lúteo hay una caída súbita a los 3 ó 4 días.

McClellan *et al.*, (1975)⁷⁹, encontraron que los niveles de progesterona en borregas superovuladas empiezan a incrementarse en el tercer día posterior a la ovulación, lo que coincide con la elevación de los niveles de progesterona en ambos grupos en el muestreo matutino del tercer día (quinto muestreo).

Con respecto a la disminución en la progesterona del grupo tratado, que se hizo evidente en el promedio matutino del día 5 (Cuadro 3) es similar en tiempo a lo mencionado por Stubbing *et al.*, (1986)⁶⁷ quienes señalan una disminución en las concentraciones de progesterona al día 3 posterior a la ovulación en cabras que experimentan falla lútea temprana. Battye *et al.*, (1988)²⁶ así como Gilbert *et al.*, (1990)⁵⁸ sugieren que la regresión lútea inicia alrededor del día 3 ó 4 después de quitar el tratamiento sincronizador. Tanto Borque *et al.*, (1993)⁶³ como Schiewe *et al.*, (1991)⁷⁷ encontraron que la regresión prematura se hace evidente en el día 4 posterior al retiro del tratamiento sincronizador, pero que los niveles de progesterona al día 3, son menores a los de una función lútea normal.

Es importante señalar que aunque en este trabajo hubo un alto porcentaje de cabras con regresión prematura en el grupo tratado no fue la totalidad de ellas, por lo que es importante mencionar que de manera individual en ambos grupos hubo animales en los que la disminución en la progesterona plasmática se hizo evidente desde el muestreo matutino del cuarto día (muestreo 7) pero en la mayoría de los animales con regresión lútea temprana la disminución se hizo clara después del octavo muestreo (día 4).

Sharma *et al.*, (1993)⁸⁰ encontraron en borregas superovuladas, que la recuperación embrionaria fue más alta cuando los niveles de progesterona se mantenían, obteniendo un 5.75 ± 0.63 de estructuras totales y un 4.75 ± 0.95 de embriones transferibles, en comparación con aquellas que muestran perfiles anormales donde se obtuvo un promedio de 2.50 ± 0.50 tanto para estructuras totales como para embriones transferibles, destacándose una disminución notoria en ambos promedios. Al comparar estos resultados con ambos grupos, es importante resaltar que en el grupo testigo donde el porcentaje de cuerpos lúteos en regresión fue menor y donde los niveles de progesterona se mantuvieron e incrementaron hasta el día de la colección, los promedios de estructuras totales y embriones transferibles son mayores a los obtenidos por Sharma *et al.*, (1993)⁸⁰ en borregas. Mientras que en el grupo tratado donde los niveles promedio de progesterona fueron descendiendo hasta el día de la colección, los valores para estructuras totales y embriones transferibles fueron superiores a lo encontrado por estos autores en borregas, pero además no tuvieron diferencia significativa con respecto al grupo testigo.

Borque *et al.*, (1993)⁶³ han mostrado que aquellos animales con un decremento significativo en las concentraciones de progesterona no proveen embriones. Stubbing *et al.*, (1986)⁶⁷ señalan que en cabras que sufren falla lútea temprana se observa un incremento de corta duración en las concentraciones de progesterona seguida de una drástica disminución a valores basales (menos de 1ng/m) como la observada en este estudio en todos los animales con regresión lútea prematura, y como la observada por Sureshkumar *et al.*, (1993)⁸² entre los días 9-13 de un ciclo normal en pequeños rumiantes. Price (1995)⁹ señala que una reducción en la secreción de progesterona durante los primeros días después de la ovulación se considera detrimental para la migración de los embriones del oviducto hacia el útero. La regresión prematura de los cuerpos lúteos con la consiguiente caída de los niveles de progesterona se ha asociado a una disminución en la recuperación embrionaria por anomalías en el transporte (4, 18, 26, 63) que provocan la expulsión anticipada de estos. Por otro lado Asworth *et al.* (1989)¹⁰ revelaron una

asociación entre diferencias en la concentración de progesterona plasmática y la sobrevivencia del embrión en ovejas servidas naturalmente.

Holst y Braden, (1972)⁶³ generaron información que sugiere que el tratamiento con estrógenos o progesterona puede interferir con el tránsito normal del cigoto, por lo que es posible que el balance entre estas dos hormonas ováricas sea importante en la regulación del transporte.

En este trabajo los niveles de progesterona fueron reflejo del estado en que se encontraba el cuerpo lúteo, pudiéndose utilizar los perfiles plasmáticos de progesterona para identificar aquellos animales con regresión lútea temprana como lo menciona Borque *et al.* (1993)⁶³.

Tomando en cuenta lo anterior se puede observar que los animales del grupo tratado, aun con un alto porcentaje de ellos con regresión prematura del cuerpo lúteo, apoyada por la disminución de los niveles de progesterona aportaron un promedio de estructuras totales y de embriones transferibles similar al grupo testigo, producto del tratamiento con el progestágeno.

Borque *et al.*, (1993)⁶³ sugieren que la administración exógena de progesterona podría usarse en la regresión temprana. Al contrario de lo que observaron Armstrong *et al.* (1982)¹³ quienes señalan que no se mejora la recuperación embrionaria en hembras con regresión lútea prematura cuando se utilizó un progestágeno al día 3.

Gilbert *et al.*, (1990)⁵⁸ utilizaron meglumina de flunixin y un dispositivo intravaginal conteniendo progesterona realizando la colección de manera no quirúrgica y lavando al día 6 obtuvieron tasas de recuperación del 79.0% y 86.9% respectivamente, siendo estos resultados muy similares a los obtenidos en el grupo tratado de este estudio, aun cuando los porcentajes de regresión lútea prematura en el trabajo de estos autores fueron menores (3.3 y 8.6% respectivamente). Estos mismos autores recomiendan el uso del dispositivo intravaginal como una medida útil para afrontar el problema de la regresión lútea temprana, ya que requiere manejar a la donadora una sola vez.

Odensvik *et al.*, (1994)⁸⁴ mencionan que la meglumina de flunixin pudiera ser benéfica en la transferencia embrionaria para mantener el cuerpo lúteo durante un

periodo crítico. Sin embargo, su administración es prolongada requiriendo para ello mas de una aplicación al día.

Stubbing *et al.*, (1986)⁶⁷ mencionan que el momento óptimo de colección es al día 6 ó 7 después de la monta o inseminación, por lo que los niveles de progesterona deben mantenerse por lo menos 6 días.

Por otro lado, Pope *et al.* (1995)⁸⁵ utilizando animales no superovulados, sugieren que la administración de progesterona exógena estimula el crecimiento de los blastocitos.

No hay una explicación clara para el elevado porcentaje de animales con regresión lútea en el grupo tratado, sin embargo, varios autores (Loy *et al* (1960)⁸⁶, Woody *et al* (1967)⁸⁷, Ginther *et al* (1970)⁸⁸, Battista *et al* (1984)⁸⁹, Garret *et al* (1988)⁹⁰, Burns *et al* (1993)⁹¹) han demostrado que la administración de progesterona posterior al estro afecta la función del cuerpo lúteo en animales ciclicos.

Loy *et al* (1960)⁸⁶ observaron un efecto detrimental sobre el cuerpo lúteo cuando se inyectaba progesterona un día después del estro; estos autores propusieron que la administración de progesterona tiende a deprimir la actividad de la LH, inhibiendo su liberación de la hipófisis, resultando en la formación de un cuerpo lúteo con pobre desarrollo y mantenimiento de su función.

Woody *et al* (1967)⁸⁷ encontraron que la administración de progesterona (25 mg/día) hacia el final del primer día del estro (día 0) y hasta el día 6, redujo significativamente la duración del ciclo estral en la oveja (16.5 días para el grupo control v.s. 12.7 días para el grupo tratado) ; esta reducción coincidió con disminución en el tamaño del cuerpo lúteo.

Ginther *et al* (1970)⁸⁸ también obtuvieron una disminución en la duración del ciclo estral en la vaca después de administrar progesterona después del celo; en esta especie el ciclo se acorto significativamente cuando se inicia la administración a partir del día 0 y hasta el día 2, concluyendo que la administración debe iniciar antes del día 3 para obtener dicho acortamiento. Estos autores propusieron que este fenómeno además de involucrar un efecto inhibitorio sobre el mecanismo

luteotrópico, tiene un efecto estimulante local del mecanismo luteolítico útero-ovárico.

Battista *et al* (1984)⁸⁹ encontraron una disminución en la duración del ciclo estral cuando administraron progesterona del día 0 al día 3 en becerras Holstein (13.2 ± 1.40 días), notando además un decremento en la concentración plasmática de hormona luteinizante. Sin embargo estos autores concluyen que las concentraciones disminuidas de LH al parecer no inhiben la secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo recién formado; esta conclusión se basó en el hallazgo de que las concentraciones plasmáticas de progesterona en las becerras tratadas con progesterona eran similares a los valores del grupo control al día 6 del ciclo. Al parecer la reducción en el soporte luteotrópico por efecto de la progesterona durante la etapa de formación del cuerpo lúteo, no era el mecanismo por el cual se ejercía el efecto de disminución en la duración del ciclo.

Garret *et al* (1988)⁹⁰ señalan que en vacas con acortamiento en la duración del ciclo estral por efecto de la administración exógena de progesterona, hubo una disminución en la progesterona plasmática que coincidió con la liberación pulsátil de prostaglandina $F2\alpha$, concluyendo que la administración exógena de progesterona, estimula la maduración temprana del mecanismo de secreción endometrial de $PGF2\alpha$.

Ottobre *et al* (1980)⁹² sugieren que la progesterona estimula la liberación temprana de $PGF2\alpha$ uterina en la oveja causando la regresión prematura del cuerpo lúteo, además señalan que la administración de progesterona poco tiempo después de la ovulación parece no afectar el desarrollo y la capacidad esteroidogénica del cuerpo lúteo.

Aún cuando en el grupo tratado la administración de un progestágeno hubiese tenido algún efecto nocivo sobre la función lútea, el tratamiento demostró tener un efecto positivo sobre la recuperación embrionaria en animales con regresión lútea temprana.

En el caso de cabra no existe información similar a la generada por Ginther *et al* (1970)⁸⁸ en la vaca, acerca del día en que se inicia el tratamiento con progesterona exógena, estos autores encontraron que al iniciarlo entre el día 3 y 5

no se acorta significativamente la duración del ciclo estral. En la cabra superovulada la regresión prematura del cuerpo lúteo ocurre alrededor del día 4, por lo que el tratamiento iniciado al día 3, quizá sea más conveniente. Sin embargo como ya se mencionó anteriormente, Armstrong *et al.* (1982)¹³ señalan que no se mejora la recuperación embrionaria en hembras con regresión lútea prematura cuando se utiliza un progestágeno al día 3..

Las observaciones producto de las correlaciones, muestran que el mantenimiento de los niveles de progesterona se refleja en un incremento de las estructuras totales y embriones transferibles. Sharma *et al.*, (1993)⁸⁰ mostraron que la respuesta superovulatoria en animales con valores normales y anormales de progesterona es similar, sin embargo la recuperación embrionaria varía.

Al estudiar la estructura del cuerpo lúteo normal en ovinos, Rodgers *et al.* (1984)³⁴ señalan que las células lúteas grandes ocupan la mayor proporción del tejido lúteo, lo cual coincide con lo observado en este estudio (Fig.1A); y con las características generales del cuerpo lúteo ovino encontradas por O'Shea *et al.* (1979)³⁷, pudiendo agregar que en este trabajo se distinguió además un delgado margen de cromatina en las células lúteas grandes y que el núcleo de las células chicas se tiñó más basófilamente (Fig.1A y 1B), aunque es importante mencionar que O'Shea *et al.* (1979)³⁷ utilizaron azul de toluidina para la tinción.

En algunas muestras ocasionalmente se observaron células con la cromatina condensada o con un mayor margen de condensación de esta en la periferia del núcleo que posiblemente correspondan a células en estado de apoptosis (Fig.1D), lo anterior se apoya en lo señalado por Nett *et al.* (1976)⁹³ donde de acuerdo con el concepto de apoptosis, la condensación y/o marginación nuclear, no ocurre sincrónicamente dentro de un tipo celular, ya que algunas células parecen normales mientras que otras ya han sufrido la condensación o marginación nuclear. Además McCormack *et al.*, (1998)⁹⁴ señalan que desde la perspectiva del gran número de células del cuerpo lúteo sería comprensible que algunas células lúteas mueran como un evento puramente aleatorio.

Con respecto a los cuerpos lúteos en regresión, una característica notoria fue la infiltración de tejido conjuntivo que se hizo evidente con la tinción tricrómica de

Masson (Fig.2B). Los cuerpos lúteos normales mostraron una escasa cantidad de tejido de sostén (Fig.1C) a diferencia de aquellos en regresión; esto último coincide con lo observado por Umo (1975)⁴³ en la oveja. Además del tejido conjuntivo, se observó una notoria disminución del tamaño celular sobre todo en el de las células grandes (Fig.2A) como la descrita por Braden *et al.* (1988)³⁶ durante la luteólisis inducida por prostaglandina F2alfa en la oveja, donde hay una disminución en el diámetro de las células lúteas grandes sin asociarse a pérdida celular.

La disminución en el tamaño celular coincide con los hallazgos de Gemmell *et al.* (1976)⁴¹ pero contrasta con Farin *et al.* (1986)³⁸ así como con Schiewe *et al.* (1991)⁷⁷ quienes apoyan la pérdida celular. La desorganización del componente celular (Fig.2C) también fue descrita por Gemmell *et al.* (1976)⁴¹ y señalan que no se restringe a las células lúteas, sino que involucra otros tipos celulares. Umo (1975)⁴³ trabajó con cuerpos lúteos de ovejas al día 15 del ciclo, evidenciando también desorganización celular y disminución en el tamaño de la célula, lo que da el aspecto de mayor espacio intercelular y dificultad para diferenciar los tipos celulares como lo señalan Sawyer *et al.* (1995)³⁹. O'Shea *et al.* (1977)⁴² confirmaron estos hallazgos en ovejas cíclicas al día 14 ó 15, pero además describen un incremento en la cantidad de lípidos, así como cambios nucleares predominantemente aglutinación y marginación de cromatina, como la observada en los cuerpos lúteos en regresión de este trabajo (Fig.2a y 2B). Gaytan *et al.* (1998)⁹⁵ también identificaron diferentes estadios en los signos de apoptosis en un mismo tejido.

Al igual que en el caso del tejido normal, donde se observaron escasas células en apoptosis, en el tejido lúteo en regresión hubo escasas células funcionales (Fig. 2B y 2C), apoyando nuevamente el concepto de la falta de sincronía en estado celular en un mismo tejido.

Ultraestructuralmente, las características de las células lúteas grandes y chicas consideradas normales en este estudio (Fig.1A,B y 2A) coinciden en forma general con lo descrito por Braden *et al.* (1988)³⁶ y por O'Shea *et al.* (1979)³⁷ en ovejas.

Se aprecian diferencias notables con respecto a la heterocromatina adherida a la membrana nuclear de las células chicas. Esta heterocromatina podría considerarse como un signo indicativo de apoptosis (Juengel *et al.* 1993)⁵⁷.

O'Shea (1979)³⁷ observó gotas de lípidos en pequeñas cantidades excepto cuando había regresión lútea, lo que coincide con este trabajo. Tomando en cuenta en las células lúteas grandes de apariencia normal la abundancia de R.E.L. (Fig.1C) concuerda con O'Shea (1979)³⁷ y Farin (1986)³⁸ la cual es justificada por su función esteroideogénica.

La morfología de las mitocondrias fue variable, tendiendo a ser redondas u ovals con crestas tubulares y matriz electrodensa (Fig.1C). Webley *et al.* (1990)⁹⁶ hacen referencia a la forma de la mitocondria, la cual puede reflejar diferencias en la producción de progesterona. Estos autores mencionan que la presencia de crestas tubulares, como la observada en el estudio, esta asociada con un incremento en la producción de progesterona después de la ovulación. Esta característica de las crestas mitocondriales es también descrita por O'Shea (1979)³⁷.

Las vesículas secretoras observadas en las células grandes (Fig.1C) coinciden con los gránulos electrodensos rodeados de membrana descritos por O'Shea *et al.* (1979)³⁷ así como por Farin *et al.* (1986)³⁸.

Gemmell *et al.*, (1976)⁴¹ han producido evidencia que sugiere que la producción de progesterona en las células lúteas grandes en la oveja puede involucrar la liberación de gránulos citoplasmáticos.

Las células lúteas grandes presentaron lisosomas, según Gemmell *et al.* (1976)⁴¹ estas estructuras están presentes en todas las etapas del ciclo, sin mostrar incrementos en una etapa en particular.

El retículo endoplásmico rugoso se presentó en forma escasa (Fig.1C), lo que podía coincidir con los hallazgos de O'Shea (1979)³⁷ y Farin (1986)³⁸ quienes hablan de acúmulos aislados de retículo endoplásmico rugoso.

Por otro lado las células chicas, como característica notable, tuvieron una gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso (Fig.2B). O'Shea *et al.* (1979)³⁷ mencionan que estas células contienen gran cantidad de retículo endoplásmico del tipo predominantemente tubular con escasos ribosomas; esta última

característica podría haber causado confusión en la clasificación del retículo endoplásmico en este estudio, ya que el retículo endoplásmico en estas células es predominantemente liso. Estos mismos autores mencionan que la presencia de estos ribosomas junto con su distribución irregular, resulta en secciones que muestran contornos donde membranas rugosas se continúan con lisas; sin embargo, también señalan que las dos formas de membranas están tan íntimamente mezcladas que describirlas por separado sería difícil y proponen que los ribosomas en la membrana del retículo endoplásmico de las células chicas, podrían representar sitios de síntesis de membrana, asociados con la reorganización de membranas en células estructuralmente estables. El trabajo de estos autores se realizó con cuerpos lúteos normales tomados en diferentes etapas del ciclo estral y de la gestación en la oveja.

La ultraestructura de los cuerpos lúteos en regresión, mostró un predominio de células lúteas en regresión. Schiewe *et al.* (1991)⁷⁷ han encontrado que para el día 6 posterior a la ovulación, la integridad lútea y la viabilidad celular estaba ausente en borregas con regresión prematura del cuerpo lúteo. La abundancia de lípidos observada en las muestras de tejido lúteo en regresión fue descrita por Gemmell *et al.* (1976)⁴¹ quienes señalan que las gotas de lípidos, raramente vistas en la célula funcional, están presentes en abundancia al día 15 del ciclo en la oveja con marcada degeneración lútea; estos mismos autores, apoyados por Stacy *et al.* (1976)⁴⁴ y por McClellan *et al.* (1975)⁷⁹ han propuesto que la acumulación de lípidos es debida a fallas en la biosíntesis de esteroides, dado que la célula es capaz de sintetizar lípidos, pero no de convertirlos a hormonas esteroides.

Gemmell *et al.* (1976)⁴¹ encontraron que en la ultraestructura de los cuerpos lúteos en regresión dominaron los elementos circulares densos que contenían masas de restos celulares; en las muestras obtenidas para este estudio hubo coincidencia con estas características (Fig.4A), donde además se observó que algunos de estos elementos habían sido digeridos por macrófagos.

Stacy *et al.* (1976)⁴⁴ y Sawyer *et al.* (1990)⁴⁵, encontraron evidencia de que al final del ciclo estral, las células lúteas degeneradas son removidas por macrófagos. Morris *et al.* (1984)⁹⁷ señalan que la apoptosis es un proceso donde las células

nucleadas son eliminadas del tejido vivo, sugiriendo que en los tejidos las células que están muriendo son reconocidas y fagocitadas tan pronto como inicia la apoptosis, la cual parece ser un proceso abrupto y capaz de remover materiales potencialmente tóxicos del espacio intercelular.

Los agrupamientos electrodensos de mitocondrias a los que se hace mención en este trabajo (Fig.5A) fueron descritos por Gemmell *et al.* (1976)⁴¹ quienes sugieren que son el resultado de la disminución del tamaño celular.

Los cambios observados en REL (Fig.5B) provocan la pérdida de su función en los cuerpos lúteos en regresión, hecho que es afirmado por Umo (1975)⁴³ y Nett *et al.* (1976)⁹³.

Los cuerpos autofagocíticos observados en el citoplasma de las células lúteas (Fig.6A) han sido descritos por Gemmell *et al.* (1976)⁴¹ en la oveja al día 15 del ciclo estral; estos mismos autores mencionan que constituyen el primer signo estructural de luteólisis, asociándolos con degradación intracelular.

Stacy *et al.* (1976)⁴⁴ estudiaron el efecto de la PGF2 alfa sobre la morfología del cuerpo lúteo en la oveja y observaron que el tratamiento, se acompaña de la aparición de cuerpos autofagocíticos; estos hallazgos son apoyados por Nett *et al.* (1976)⁹³.

Los cambios apoptóticos en el tejido lúteo han sido descritos por varios autores (O'Shea 1977⁴², 1986³⁵; Nett, 1976⁹³; Sawyer, 1990⁴⁵; Juengel, 1993⁵⁷; McCormack, 1998⁹⁴) en la oveja, la vaca y hamster y coinciden con lo observado en la cabra (Fig.7A). Vega (1999)⁹⁸ señala que la apoptosis es un proceso fisiológico que ocurre en los tejidos reproductores, el cual es regulado por factores de producción local.

Juengel *et al.* (1993)⁵⁷ mencionan que los estudios en regresión del cuerpo lúteo se han limitado a especies en las cuales la apoptosis ocurre como un evento relativamente lento y que se da después que los niveles de progesterona han empezado a descender.

En las preparaciones observadas no se apreciaron vesículas secretoras, lo cual coincide con las observaciones de Gemmell *et al.* (1976)⁴¹ y Nett *et al.* (1976)⁹³.

Una característica que no fue observada en este estudio es la acumulación de

lípidos en la ultraestructura de las células en regresión, como la descrita por Stacy *et al.* (1976)⁴⁴, Nett *et al.* (1976)⁹³ y Sawyer *et al.* (1990)⁴⁵.

En este estudio, cuando se clasificaron los cuerpos lúteos como en regresión, en todos los casos coincidió con una disminución de los niveles de progesterona. Nett *et al.* (1976)⁹³ han descrito los cambios estructurales durante la luteólisis y mencionan que todos estos cambios se acompañan de una disminución precipitada de las concentraciones circulantes de progesterona. Braden *et al.* (1988)³⁶ señalan que la luteólisis funcional se da antes que la estructural.

McCormack (1998)⁹⁴ ha sugerido que la caída en los niveles hormonales dispara la apoptosis siendo en este caso la progesterona la candidata, destacando además que hay una separación de varias horas entre la luteólisis funcional y estructural, proponiendo que la apoptosis es una consecuencia y no la causa de la regresión lútea en el hamster. Esta disociación temporal también es descrita por Juengel (1993)⁵⁷ en la vaca.

VI. Conclusiones

La regresión lútea prematura es un fenómeno que de manera práctica no puede evitarse, pero la aplicación de Acetato de Fluorogestona (FGA) en esponjas vaginales al finalizar el celo, reduce los efectos de este fenómeno en cabras superovuladas, mejorando la recuperación embrionaria cuando el lavado se realiza al día 6 o 7 posterior a la monta. Aunque al parecer predispone a una mayor presentación de regresión lútea.

La descripción de las características macroscópicas de los cuerpos lúteos al momento de exteriorizar los ovarios es un método confiable para su clasificación.

Las características morfológicas de los cuerpos lúteos de cabra observados tanto en la microscopía óptica como en la electrónica coinciden con las descripciones de los cuerpos lúteos funcionales y en regresión de otras especies. Así mismo se observó que tanto el tejido sano como aquel que sufre regresión, muestra una proporción mínima de células con características contrarias a las del tipo predominante.

La determinación temprana de los niveles plasmáticos de progesterona puede ser una herramienta útil para detectar la regresión lútea prematura en la cabra.

VII. Literatura Citada

1. Cownie Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 1999;51:105-116.
2. Pendleton RJ, Youngs CR, Rorie RW, Pool SH, Memon, MA, Godke RA. Follicle stimulating hormone *versus* pregnant mare serum gonadotropin for superovulation of dairy goats. *Small Rum Res* 1992;8:217-224.
3. Remy B, Baril G, Vallet JC, Dufour R, Chouvet C, Saumande J, Chupin D, Beckers JF. Are antibodies responsible for a decreased superovulatory response in goats which have been treated repeatedly with porcine follicle-stimulating hormone?. *Theriogenology* 1991;36,3:389-399.
4. Nowshari MA, Beckers JF, Holtz W. Superovulation of goats with purified pFSH supplemented with defined amounts of pLH. *Theriogenology* 1995;43:797-802.
5. Senn BJ, Richardson ME. Seasonal effects on caprine response to synchronization of estrus and superovulatory treatment. *Theriogenology* 1992;37: 579-585.
6. Bindon BM, Piper LR, Cahill LP, Driancourt MA, O'Shea T. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology* 1986;25,1:53-60.
7. Ishwar AK, Memon MA. Embryo transfer in sheep and goat: a review. *Small Rum Res* 1996;19:35-43.
8. Tervit HR, Gold PG, Mckenzie RD. Development of an effective goat embryo transfer regime. *Proc NZ Soc Anim Prod* 1986;46:233-236.
9. Price CA. Increasing ovulation rate in goats. *Congreso Internacional en Producción Caprina*; octubre 1995, Zacatecas, Zac., México 74-78.
10. Ashworth, CJ, Sales DI, Driancourt MA. Evidence of an association between the survival of the embryos and the periovulatory plasma progesterone concentration in ewe. *J Reprod Fertil* 1989;87:23-32.
11. Pintado B, Gutierrez-Adán A, Pérez B, Garde J. Influence of the synchronization treatment on the superovulatory response of murciana goats. *Small Rum Res* 1996;23:135-141.
12. Nuti LC, MBS, Baker WC, Capehart JS, Marrack P. Superovulation and recovery of zygotes from nubian and alpine dairy goats. *Theriogenology* 1987;28,4:481.
13. Armstrong DT, Pfitzner AP, Seamark RF. Ovarian responses and embryo survival in goats following superovulation and embryo transfer. *Theriogenology* 1982;17,1:76.

14. Armstrong,DT, Evans G. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 1983;19,1:31-42.
15. Armstrong DT, Pfitzner AP, Warnes GM, Ralph MM, Seamark RF. Endocrine response of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. *J Reprod Fertil* 1983;67:395-401.
16. Batt PA, Killen ID, Cameron WN. Use of single or multiple injections of FSH in embryo collection programmes in goats. *Reprod Fertil Dev* 1993;5:49-56.
17. Kumar,J, Osborn JC, Cameron Awn, Trounson AO. Follicular steroidogenesis and oocyte maturation after superovulation of goats (*Capra hircus*) with gonadotropins. *J Reprod Fertil* 1992; 95:371-383.
18. Armstrong,DT, Pfitzner AP, Warnes GM, Seamark RF. Superovulation treatment and embryo transfer in angora goats. *J Reprod Fertil* 1983;67:403-410.
19. Callensen H, Greve T, Hyttel P. Premature ovulation in superovulated cattle. *Theriogenology* 1987;28:155-166.
20. Moor RM, Kruij ThAM, Green D. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation?. *Theriogenology* 1984;21,1:103-110.
21. Armstrong DT, Kiehm DJ, Warnes GM, Seamark RF. Corpus luteum (CL) failure and embryonic loss in superovulated goats. *Theriogenology* 1987;27:1.
22. Garverick HA, Smith MF. Mechanisms associated with subnormal luteal function. *J Anim Sci* 1986;62(suppl.2):92-105.
23. Garverick HA, Zollers WG, Smith MF. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. *Anim Reprod Sci* 1992;28:111-124.
24. White LM, Keisler DH, Dailey RA, Inskeep EK. Characterization of ovine follicles destined to form subfunctional corpora lutea. *J Anim Sci* 1987;65:1595-1601.
25. Hunter MG. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. *J Reprod Fertil* 1991;Suppl 43:91-99.
26. Battye KM, Fairclough RJ, Cameron Awn, Trounson AO. Evidence for prostaglandin involvement in early luteal regression of the superovulated nanny goat (*Capra hircus*). *J Reprod Fertil* 1988;84:425-430.
27. Wiltbank MC, Niswender GD. Functional aspects of differentiation and degeneration on the steroidogenic cells of the corpus luteum in domestic ruminants. *Anim Reprod Sci* 1992;28:103-110.
28. Baird D. Lutetrophic control of the corpus luteum. *Anim Reprod Sci* 1992;28:95-102.

29. Smith MF, Mc Intush EW, Smith GW. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci* 1994;72:1857-1872.
30. Niswender GD, Juengel JL, McGuire WJ, Belfiore CJ, Wiltbank MC. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 1994;50:239-247.
31. Niswender GD, Nett TM. The corpus luteum and its control. In: E Knobil, J Neill et al. (Editors), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, 1988;489-525.
32. Rodgers RJ, O'Shea JD, Findlay JK. Do small and large luteal cells of the sheep interact in the production of progesterone?. *J Reprod Fertil* 1985;75:85-94.
33. Rodgers RJ, O'Shea JD, Findlay JK, Flint APF, Sheldrick EL. Large luteal cells the source of luteal oxytocin in sheep. *Endocrinology* 1983;113:2302-2304.
34. Rodgers RJ, O'Shea JD, Bruce NW. Morphometric analysis of the cellular composition of the ovine corpus luteum. *J Anat* 1984; 138,4:757-769.
35. O'Shea JD, Rodgers RJ, Wright PJ. Cellular composition of the sheep corpus luteum in the mid and late luteal phase of the oestrus cycle. *J Reprod Fertil* 1986;76:685-691.
36. Braden TD, Gamboni F, Niswender GD. Effects of prostaglandin F 2 alpha induced luteolysis on the population of cells in the ovine corpus luteum. *Biol Reprod* 1988;39:245-253.
37. O'Shea JD, Cran DG, Hay MF. The small luteal cell of the sheep. *J Anat* 1979;128, 2:239-251.
38. Farin CE, Moeller CL, Sawyer HR, Gamboni F, Niswender GD. Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biol Reprod* 1986;35,1:299-1308.
39. Sawyer HR. Structural and functional properties of the corpus luteum of pregnancy. *J Reprod Fertil* 1995;49:97-110.
40. Paavola LG, Christensen AK. Characterization of granule types in luteal cells of sheep at the time of maximum progesterone secretion. *Biol Reprod* 1981;25:203-215.
41. Gemmell RT, Stacy BD, Thorburn GD. Morphology of the regressing corpus luteum in the ewe. *Biol Reprod* 1976;14:270-279.
42. O'Shea JD, Nightingale MG, Chamley WA. Changes in small blood vessels during cyclical luteal regression in sheep. *Biol Reprod* 1977;17:162-177.
43. Umo I. Effect of prostaglandin F2 alpha on the ultrastructure and function of sheep corpora lutea. *J Reprod Fertil* 1975;43:287-292.

44. Stacy BD, Gemmell RT, Thorburn GD. Morphology of the corpus luteum in the sheep during regression induced by prostaglandin F2 alpha. *Biol Reprod* 1976;14:280-291.
45. Sawyer HR, Niswender KD, Braden TD, Niswender GD. Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF2 alpha. *Dom Anim Endo* 1990;7,2:229-238.
46. McClellan MC, Abel, JH, Niswender GD. Function of lysosomes during luteal regression in normally cycling and PGF2 alpha treated ewes. *Biol Reprod* 1977;16:499-512.
47. Schramm W; Bovaird L, Glew ME, Schramm G, Mc Cracken JA. Corpus luteum regression induced by ultra-low pulses of prostaglandin F2 alpha. *Prostaglandins*. 1983;6,3:347-364.
48. Milvae RA, Duby RT, Tritschler IJJP, Pekala RF, Gnatek GG, Bushmich SL, Schreiber Jr DT. Function and lifespan of corpora lutea in ewes treated with exogenous oxytocin. *J Reprod Fertil* 1991;92:133-138.
49. Silvia WJ, Lewis GS, McCracken JA, Thatcher WW, Wilson Jr L. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F2 alpha during luteolysis in ruminants, a review. *Biol Reprod* 1991;45:655-663.
50. Flint APF, Sheldrick EL. Evidence for a systemic role for ovarian oxytocin in luteal regression in sheep. *J Reprod Fertil* 1983;67:215-225.
51. Silvia WJ, Raw RE. Regulation of pulsatile secretion of prostaglandin F2 alpha from the ovine uterus by ovarian steroids. *J Reprod Fertil* 1993;98:341-347.
52. Beard AP, Lamming GE. Oestradiol concentration and the development of the uterin oxytocin receptor and oxytocin-induced PGF2 alpha release in ewe. *J Reprod Fertil* 1994;100:469-475.
53. Lau TM, Gow CB, Fairclough RJ. Increases in the oxytocin-induced prostaglandin F2 alpha response and reduction in the concentrations of endometrial oxytocin receptors in ewe in response to progesterone. *J Reprod Fertil* 1992;95:11-18.
54. Baird DT. Prostaglandin F2 alpha and ovarian blood flow in the sheep. *J Endocr* 1974;62:413-414.
55. Pate JL. Cellular components involved in luteolysis. *J Anim Sci* 1994;72:1884-1890.
56. Fitz TA, Mayan MH, Sawyer HR, Niswender GD. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. *Biol Reprod* 1982;27:703-711.
57. Juengel LJ, Garverick HA, Johnson AL, Youngquist RS, Smith MF. Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology* 1993;132,1:249-254.

58. Gilbert DE, Conrad SA, Whiting CJ, Pashen RL. Comparison of a progesterone intravaginal device (CIDR. TM.) with flunixin meglumine (finadyne TM) for reducing the effects of corpora lutea regression in the goat. *Theriogenology* 1990;33:1.
59. Saharrea A, Valencia J, Balcázar A, Mejía O, Cerbón JL, Caballero V, Zarco L. Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. *Theriogenology* 1998;50:1039-1052.
60. Villa-Godoy A, Ireland JJ, Wortman JA, Ames NK, Hughes TL, Fogwell RL. Effect of ovarian follicles on luteal regression in heifers. *J Anim Sci* 1985;60:2.
61. Niswender GD. Mechanisms controlling luteolysis. In: N.B. Schwartz and M. Hunziker-Dunn (Ed.) *Dynamics of Ovarian Functions*. Raven Press, New York, 1981:153-160
62. Cooke RG, Homeida AM. Prevention of luteolytic action of oxytocin in the goat by inhibition of prostaglandin synthesis. *Theriogenology* 1983;20:363-365.
63. Borque C, Pintado B, Pérez B, Gutiérrez A, Muñoz I, Mateos I. Progesterone levels in superovulated murciana goats with or without successful embryo collection. *Theriogenology* 1993;39:192.
64. Mejía VO, Murcia MC, Valencia MJ, Espinosa AF. Administración posmonta de acetato de fluorogestona en ovejas donadoras de embriones. *Vet. Méx* 2000; 31 (2): 129-135.
65. García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía: Universidad Nacional Autónoma de México, 1973.
66. Srikandakumar A, Ingraham RH, Ellsworth M, Archbald LF, Liao A, Godke RA. Comparison of a solid phase no extraction radioimmunoassay for progesterone with and extraction assay for monitoring luteal function in the mare, bitch and cow. *Theriogenology* 1986;26:779-793.
67. Stubbings RB, Bosu WTK, Barker CAV, King GJ. Serum progesterone concentrations associated with superovulation and premature corpus luteum failure in dairy goats. *Can J Vet Res* 1986;50:369-373.
68. Mejía VO, Balcázar SA, Luyando GC, Valencia MJ, Rojas MS, Saharrea MA, Caballero GV, Cerbón GJ. Implementación de la transferencia de embriones en pequeños rumiantes. *Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria* 1995; 21-22 de Noviembre de 1995; México, D.F., México: SAGAR UACH, Paipeme, CP, UNAM, FMVZ, FESC. *Vet Méx* 1995;26 (Suppl.2):340.
69. SAS Institute: *SAS / STAT Guide for personal computers*. Version 6.08 edc. Cary (NC) : SAS Institute Inc; USA 1995.
70. Goel AK, Agrawal KP. Superovulation and embryo collection in jamunapari goats. *Theriogenology* 1990;33,1:232.

71. Taneja CH, Pawshe CS, Guron G, Singh SM, Totey and Talwar GP. Superovulations of barbari goats with follitropin: the effect of dose. *Theriogenology* 1991;35,1:280.
72. Saharrea MA.. Efecto de la administración de hormona liberadora de gonadotropinas o gonadotropina coriónica humana 84 horas después de iniciado el estro sobre la luteinización de los folículos anovulatorios y la calidad de los embriones en cabras superovuladas (tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, 1996.
73. Selgrath JP, Memon MA, Smith TE, Ebert KM. Collection and transfer of microinjectable embryos from dairy goats. *Theriogenology* 1990;34,6:1195-1205.
74. Walker SK, Smith DH, Seamark RF. Timing of multiple ovulations in the ewe after treatment with FSH or PMSG with and without GnRH. *J Reprod Fertil* 1986;77:135-142.
75. Beckers JF, Baril G, Vallet JC, Chupin D, Remy B, Saumande J. Are porcine follicles stimulating hormone antibodies associated with decreased superovulatory response in goat?. *Theriogenology* 1990;33,1:192.
76. Krisher RL, Gwazdauskas FC, Page RL, Russel MCG, Canseco RS, Sparks AET, Velander WH, Johnson JL, Pearson RE. Ovulation rate, zygote recovery and follicular populations in FSH-superovulated goats treated with PGF2 alpha and/or GnRH. *Theriogenology* 1994;41:491-498.
77. Schiewe MC, Fitz TA, Brown JL, Stuart LD, Wildt DE. Relationship of oestrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing hormone and prostaglandin F2alfa receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. *J Reprod Fertil* 1991;93:19-30
78. Pathiraja N, Oyedipe EO, Gyang EO, Obasi A. Plasma progesterone levels during oestrous cycle and their relationship with the ovulation rate in the red sokotto (maradi) goats. *Br Vet J* 1991;147:57-62.
79. McClellan MC, Diekman MA, Abel JrJH, Niswender GD. Luteinizing hormone, progesterone and the morphological development of normal and superovulated corpora lutea in sheep. *Cell Tiss Res* 1975;164:291-307.
80. Sharma VK, Gupta RC, Khar SK, Khurana NK. Plasma progesterone profiles, ovarian response and embryo recovery in crossbred ewes superovulated during breeding and non-breeding seasons. *Anim Reprod Sci* 1993;34:119-126.
81. Ryot KD, Vadnere SV, Lakhchaura BD. Plasma progesterone profiles in superovulated and oestrous synchronized goats. *Ind J Anim Res* 1992;13,1:28-29.

82. Sureshkumar, PK, Mehta VM, Janakiraman K. Progesterone concentration and luteal cellular changes during oestrous cycle of marwari goats. *Ind J Anim Sci* 1993;63,6:646-648.
83. Holst PJ, Braden AWH. Ovum transport in the ewe. *Aust J Biol Sci* 1972;25:167-173.
84. Odensvik K, Gustafsson H. Effect of flunixin during asynchronous embryo transfer in the heifer. *Anim Reprod Sci* 1994;36:13-24.
85. Pope WF, Cárdenas H, Wiley TM, McClure KE. Dose-response relationships of exogenous progesterone shortly after ovulation on estrous cycle length, blastocyst development and fertility in sheep. *Anim Reprod Sci* 1995;38:109-117.
86. Loy RG, Zimbelman RG, Casida LE. Effects of ovarian hormones on the corpus luteum of the estrual cycle in cattle. *J Anim Sci.* 1960; 19: 175-182.
87. Woody CO, First NL, Pope AL. Effect of exogenous progesterone on estrous cycle length. *J Anim Sci.* 1967; 26: 139-141.
88. Ginther OJ. Effect of progesterone on length of estrous cycle in cattle. *Am J Vet Res.* 1970; 31;3: 493-496.
89. Battista PJ, Rexroad CL, Williams WE. Effects of progesterone administered to dairy heifers on sensitivity of corpora lutea to PGF₂ α and on plasma LH concentrations. *Theriogenology.* 1984; 22;1: 47-58.
90. Garret JE, Geisert RD, Zavy MT, Gries LK, Wettemann RP, Buchanan DS. Effect of exogenous progesterone on prostaglandin F₂ α release and the interestrus interval in the bovine. *Prostaglandins.* 1988; 36:85.
91. Burns PD, Spitzer JC, Bridges WC, Henricks DM, Plyler BB. Effects of metestrus administration of a norgestomet implant and injection of norgestomet and estradiol valerate on luteinizing hormone release and development and function of corpora lutea in suckled beef cows. *J Anim Sci.* 1993;71: 983-988.
92. Ottobre JS, Lewis GS, Thayne WV, Inskeep EK. Mechanism by which progesterone shortens the estrous cycle of the ewe. *Biol Reprod.* 1980; 23: 1046-1053.
93. Nett TM, McClellan MC, Niswender GD. Effects of prostaglandins on the ovine corpus luteum: blood flow, secretion of progesterone and morphology. *Biol Reprod* 1976;15:66-78.
94. McCormack JT, Friederichs MG, Limback SD, Greenwald GS. Apoptosis during spontaneous luteolysis in the cyclic golden hamster: biochemical and morphological evidence. *Biol Reprod* 1998;58:255-260.

95. Gaytán F, Bellide C, Morales C, Sánchez-Criado JE. Both prolactin and progesterone in proestrus are necessary for the induction of apoptosis in the regressing corpus luteum of the rat. *Biol Reprod* 1998;59:1200-1206.
96. Webley GE, Richardson MC, Smith CA, Masson GM, Hearn J.P. Size and distribution of luteal cells from pregnant and non-pregnant marmoset monkeys and a comparison of the morphology of marmoset luteal cells with those from the human corpus luteum. *J Reprod Fertil* 1990;90:427-437.
97. Morris RG, Hargreaves AD, Duvall E, Wyllie AH. Surface changes in thymocytes undergoing apoptosis. *Am J Path* 1984;115,3. 426-436.
98. Vega M. Apoptosis: mecanismo fisiológico en el proceso reproductivo humano. Abstract X Reunión SCHRYD. Santiago de Chile, Chile. 1999.