



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

Maestría en Ciencias y de la Producción Animal  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Reproducción Equina

## **EFFECTO DE UN ANTAGONISTA DE GnRH EN LA FORMACIÓN DE FOLÍCULOS ANOVULATORIOS HEMORRÁGICOS EN GESTACIONES EQUINAS**

T E S I S  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

LIZETH ARELY VELOZ MOCHCA

T.P- Ana Myriam Boeta Acosta (FMVZ)

C.T- Ana María Rosales Torres (UAM-X)

Luis Alberto Zarco Quintero (FMVZ)

MÉXICO, D. F. ENERO 2016



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***

Por estar siempre conmigo, guiarme y apoyarme. Porque sin su ayuda no hubiese podido dar el último paso para la culminación del presente trabajo. Una vez más este es un logro no solo mío sino también suyo.

### ***A mi hermano***

Por tu amistad incansable e incondicional, por ser como eres.

### ***A Óscar***

Por tu enorme paciencia, por mantenerte en pie todo momento, estar conmigo y permitirme crecer a tu lado. Finalmente lo logramos!! Te amo

### ***A Zyanya***

Eres muy pequeña aun pero en su momento sabrás que fuiste la razón por la que seguí adelante, espero poder ser en un futuro, junto con tu papá, un modelo a seguir para ti. Eres mi alegría, te amo.

### ***A Mangué***

**Por todo el amor que siempre me ha dado y ser uno de mis pilares.**

## AGRADECIMIENTOS

A la *Universidad Nacional Autónoma de México* por ser mi segundo hogar, darle curso a mi vida y porque me ha permitido ver, aprender, conocer y disfrutar de ella y de toda la comunidad universitaria.

A la *Dra Myriam Boeta* por permitirme formar parte de su equipo, por las enseñanzas y su enorme paciencia durante la realización de la tesis.

A la *Dra Anita Rodríguez* por su apoyo incansable, las enseñanzas, los consejos, su amistad y por su colaboración para la medición hormonal de esta tesis.

Al *Equipo de Reproducción Equina* por todos esos buenos momentos que pasamos en el Rancho San Francisco aprendiendo y riendo, por las clases de baile, las parrilladas, las salidas a bailar, por ayudarme a cuidar y revisar a las yeguas del proyecto.

A *Alain y Mary Cruz* por su enorme apoyo durante la realización de la tesis y durante las crisis dentro y fuera del rancho, por ser un gran equipo finalmente y más importante, por su amistad.

A *Carmen Casillas y Fidel Ornelas* por ser como son, por el gran apoyo que nos han dado, por querer a mi hija y cuidarla, por estar siempre presentes y atentos; y porque con su ayuda este trabajo llegó a su término.

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar morfológica y endocrinológicamente la formación de folículos anovulatorios hemorrágicos durante la gestación equina por efecto de un antagonista de GnRH. Para ello se emplearon 10 yeguas gestantes clínicamente sanas, con historial de 1-3 partos, un rango de edad entre 5-10 años que fueron divididas al azar en tres grupos: control (C) (n=4), anti-GnRH (AG) (n= 3) y anti-GnRH+hCG (AGhCG) (n=3). Los grupos fueron monitoreados por ultrasonografía en modo B y Doppler a color desde el día 30 de gestación al día 81. Durante los 35 a 81 días de gestación se tomaron muestras de sangre dos veces por semana y se administró el antagonista de GnRH "Antarelix" (D-Nal, D-Phe, D-Pal, 4, Phe, D-Hcit, 7, Lys (iPr), 9, D-Ala) a los grupos AG y AGhCG a una dosis de 0.01 mg/kg IV diariamente por 7 días y después a dosis de 0.07 mg/kg por vía SC una vez a la semana durante 5 semanas además, el grupo AGhCG recibió una dosis de 1500 UI de hCG en presencia de un folículo de 35-37 mm de diámetro. La aspiración folicular se realizó al observar un folículo con alteraciones en el antro o bien, 24 h post administración de hCG. En líquido folicular se determinó la concentración de progesterona, estradiol, PGFM y VEGF; y en plasma, progesterona, estradiol y eCG. Los resultados indicaron que con la supresión de LH hipofisiaria se inhibió la ovulación secundaria y en su lugar se formaron cuerpos lúteos accesorios, confirmando que la eCG por sí sola no es capaz de inducir la ovulación. La LH hipofisiaria tiene efecto luteogénico y luteotrópico pero principalmente luteogénico debido a que es necesaria para llevar a cabo la ovulación, además de que con su presencia el número de estructuras lúteas accesorias es mayor que el formado por la eCG (actuando sin la sinergia con LH) y que el periodo de formación de cuerpos lúteos es más rápido si la LH está presente. Por el contrario, la actividad de eCG es exclusivamente luteotrópica al estimular una mayor secreción de progesterona, por los cuerpos lúteos, que la LH y por el hecho de que no es capaz por sí sola de inducir la ovulación. En cuanto a las concentraciones plasmáticas se observó una relación entre la concentración de P4 y el número de glándulas lúteas formadas de modo que, las yeguas que formaron tres cuerpos lúteos tuvieron mayor

producción de progesterona que las que formaron dos o menos cuerpos lúteos, sin embargo, no hay diferencia en la secreción de progesterona entre las yeguas que forman tres cuerpos lúteos accesorios/FAHs o más. En líquido folicular se observó que la concentración de estradiol y VEGF fue mayor en el grupo testigo; la concentración de progesterona en los grupos experimentales y la de PGFM fue similar entre grupos. Se encontró que la LH hipofisiaria es relevante para ovulación, influyendo en el nivel hormonal de estradiol, VEGF y PGFM intrafolicular que determinan en conjunto el curso del folículo hacia la ovulación o anovulación. Finalmente, se encontró que las alteraciones en líquido folicular al ultrasonido pueden darse en folículos desde 25 mm de diámetro.

	CONTENIDO	PAG
I.	INTRODUCCIÓN _____	1
II.	OBJETIVOS _____	3
III.	HIPÓTESIS _____	3
IV.	REVISIÓN DE LA LITERATURA _____	4
	A. GnRH _____	4
	1. Mecanismo de acción _____	4
	2. Receptores _____	4
	3. Segundos mensajeros _____	3
	4. Análogos peptídicos _____	6
	B. Hormonas gonadotrópicas _____	7
	1. Hormona folículo estimulante (FSH) _____	7
	2. Hormona luteinizante (LH) _____	8
	C. Foliculogénesis _____	8
	D. Dinámica folicular _____	9
	E. Atresia folicular _____	10
	F. Producción folicular de estradiol _____	11
	G. Hormonas intrafoliculares durante la desviación folicular _____	12
	1. IGF _____	12
	2. VEGF _____	13
	H. Prostaglandinas y tromboxanos _____	16
	I. Mecanismo de la ovulación _____	16
	J. Función y regulación del cuerpo lúteo _____	17
	K. Gestación temprana en la yegua _____	18

L.	Folículos anovulatorios hemorrágicos (FAHs)	20
1.	Antecedentes	20
2.	Incidencia	20
3.	Etiología	20
4.	Hallazgos	21
5.	Técnicas diagnósticas	21
	a) <i>Ultrasonografía modo B</i>	21
	b) <i>Ultrasonografía doppler a color</i>	22
	c) <i>Obtención de líquido folicular para medición hormonal</i>	23
V.	MATERIAL Y MÉTODOS	24
A.	Modelo conceptual	24
B.	Localización	25
C.	Población	25
D.	Ultrasonografía	25
E.	Tratamiento	26
F.	Obtención de líquido folicular	26
G.	Medición de PGFM, VEGF, E2 y P4 en líquido folicular	27
H.	Determinación de P4, E2 y eCG en suero	27
I.	Análisis estadístico	28
J.	Diagrama del experimento	29
VI.	RESULTADOS	30
A.	Formación de cuerpos lúteos suplementarios	30
B.	Falla en la ovulación de yeguas gestantes tratadas con un antagonista de GnRH (Grupo AG y AGhCG)	32
1.	Cuerpos lúteos suplementarios	32

2.	Cuerpos lúteos accesorios o FAH's _____	32
C.	Falla en la ovulación de yeguas con gestación equina que no recibieron tratamiento con un antagonista de GnRH (Grupo control)_____	33
1.	Cuerpos lúteos suplementarios _____	34
2.	Cuerpos lúteos accesorios o FAH's _____	34
D.	Caracterización de cuerpos lúteos accesorios o folículos anovulatorios hemorrágicos (FAH's) _____	35
1.	Alteraciones en el antro folicular _____	35
2.	Diámetro máximo de los cuerpos lúteos accesorios o FAH's _____	35
3.	Periodo de formación _____	36
4.	Alteraciones observadas a la ultrasonografía modo B en los FAH's _____	37
5.	Secuencias de formación de los FAH's _____	41
6.	Flujo sanguíneo de los FAH's _____	42
E.	Efecto del antagonista de GnRH y hCG en la formación de folículos anovulatorios hemorrágicos. _____	43
F.	Concentración hormonal de P4, eCG y E2 en yeguas gestantes (35-84 días de gestación) _____	44
1.	Concentración hormonal en yeguas tratadas con un antagonista el GnRH _____	51
2.	Concentración hormonal en yeguas tratadas con un antagonista de GnRH y hCG _____	55
3.	Concentración hormonal en yeguas control _____	60
G.	Concentración intrafolicular de VEGF, PGF2alfa, E2 y P4 _____	65
VII.	DISCUSIÓN _____	66
A.	Formación de cuerpos lúteos suplementarios (Cuerpos lúteos secundarios y accesorios/FAHs)_____	66

B.	Caracterización de folículos anovulatorios hemorrágicos/cuerpos lúteos accesorios.	67
C.	Efecto del antagonista de GnRH en asociación con hCG en la formación de folículos anovulatorios hemorrágicos.	69
D.	Relación entre la concentración hormonal de P4, eCG y E2 con la formación de cuerpos lúteos accesorios / FAHs.	71
E.	Perfiles hormonales y formación de cuerpos lúteos accesorios.	74
F.	Concentración intrafolicular de VEGF, PGF2 alfa, E2 y P4.	78
VIII.	CONCLUSIONES	82
IX.	LITERATURA CITADA	83
X.	ANEXO- PERFILES HORMONALES DE LAS YEGUAS NO INCLUIDAS EN EL CUERPO DEL CAPÍTULO VII	94
A.	Concentración hormonal de una yegua tratada con un antagonista de GnRH que presentó múltiples luteinizaciones durante el periodo de experimental.	94
B.	Concentración hormonal en yeguas con antagonista de GnRH que no formaron folículos anovulatorios hemorrágicos	95
C.	Concentración hormonal en una yegua del grupo control que no formó cuerpos lúteos accesorios	100

## LISTA DE CUADROS

PAG

**Cuadro 1.** Formación de cuerpos lúteos secundarios y accesorios en yeguas tratadas con un antagonista de GnRH. \_\_\_\_\_ 32

**Cuadro 2.** Formación de cuerpos lúteos secundarios y accesorios en las yeguas que no recibieron tratamiento con el antagonista de GnRH. \_\_\_\_\_ 33

**Figura 1.1** Número de cuerpos lúteos suplementarios (media  $\pm$  ee) que acumuló cada grupo de estudio durante el periodo experimental. En la semana 9 el grupo control fue significativamente mayor que los otros dos ( $p < 0.05$ )\_\_\_\_\_ 30

**Figura 1.2** Número de cuerpos lúteos suplementarios (media  $\pm$  ee) que acumuló cada grupo de estudio. El asterisco indica el grupo que fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ).\_\_\_\_\_ 31

**Figura 1.3** Número de cuerpos lúteos suplementarios (media  $\pm$  ee) que se acumularon durante el periodo de estudio en los grupos experimentales y el control.\_\_\_\_\_ 31

**Figura 2.** Número de cuerpos lúteos accesorios formados en yeguas que recibieron el tratamiento con un antagonista de GnRH y las que recibieron antagonista de GnRH+hCG. El mayor número de estructuras lúteas accesorias se dio durante la semana 8 de gestación. El área sombreada representa el periodo de tratamiento con el antagonista de GnRH.\_\_\_\_\_ 33

**Figura 3.** Número de cuerpos lúteos suplementarios formados entre los días 35 a 84 de gestación en las yeguas que no recibieron el tratamiento con un antagonista de GnRH. El mayor número de estructuras lúteas accesorias se formó durante la semana 9 de gestación. El área sombreada representa el periodo de tratamiento con el anti-GnRH.\_\_\_\_\_ 34

**Figura 4.** Diámetro folicular en el que se observaron las primeras alteraciones del antro folicular.\_\_\_\_\_ 35

**Figura 5.** Diámetro folicular que alcanzaron los FAH's.\_\_\_\_\_ 36

**Figura 6.** Periodo promedio de formación de los FAHs en las yeguas control y en las yeguas que recibieron el antagonista de GnRH. Los FAHs del grupo control tuvieron un periodo de formación menor al de los otros grupos.\_\_\_\_\_ 36

**Figura 7.1** Secuencia de formación de FAH No 1. a) Folículo sin alteraciones, b,c) Puntilleo ecogénico, d) Aparición de cadenas ecogénicas, e) Regresión folicular, f) Luteinización, g) cuerpo lúteo formado. Diámetro mayor alcanzado: 35 mm.\_\_\_\_\_ 37

**Figura 7.2** Secuencia de formación de FAH No. 2. a) Puntilleo ecogénico, b) Aparición de cadenas ecogénicas, c,d) Formación de trabéculas, e) Luteinización, f) cuerpo lúteo. Diámetro máximo alcanzado de 40 mm.\_\_\_\_\_ 38

**Figura 7.3** Secuencia de formación de FAH No. 3. a) Ligero puntilleo ecogénico, b,c) Inicia luteinización desde la periferia folicular, d) Luteinización completa. Máximo crecimiento observado fue de 35 mm. \_\_\_\_\_ 38

**Figura 7.4** Secuencia de formación de FAH No. 4. a,b,c) Aparición de zona ecogénica, d) Puntilleo ecogénico, e) Luteinización desde la periferia, f) cuerpo lúteo. Observado en folículos de 20-25 mm diámetro. Diámetro mayor alcanzado 35 mm. \_\_\_\_\_ 39

**Figura 7.5** Secuencia de formación de FAH Clásica. a) folículo sin alteraciones, b) Puntilleo ecogénico, c) Aparición de cadenas ecogénicas, d) Formación de trabéculas, e,f) Crecimiento mayor a 50 mm de diámetro, g) Luteinización. \_\_\_\_\_ 40

**Figura 8.** Porcentaje de formación de FAH's de cada una de las secuencias descritas. La secuencia que predominó durante el presente estudio fue la secuencia clásica. \_\_\_\_\_ 41

**Figura 9.** Comparación del flujo sanguíneo en la pared folicular de un folículo preovulatorio y cuatro que presentaron falla en la ovulación. Haciendo un monitoreo cada 24 hrs, no se encontró diferencia en el flujo sanguíneo entre los folículos preovulatorios y los preFAH's. \_\_\_\_\_ 42

**Figura 10.** Desarrollo de folículos anovulatorios hemorrágicos después del tratamiento con un antagonista de GnRH y la posterior administración de hCG en folículos mayores de 35 mm de diámetro observados mediante ultrasonografía modo B y Doppler a color. \_\_\_\_\_ 43

**Figura 11.1** Concentración de progesterona (media  $\pm$  ee) en yeguas con gestación equina entre los 35 y 84 días de gestación. El área sombreada indica el periodo de tratamiento con el antagonista de GnRH que recibieron las yeguas dentro de los grupos experimentales. \* indica las semanas en las que hubo diferencia. \_\_\_\_\_ 44

**Figura 11.2** Concentración de progesterona por grupo de estudio (media  $\pm$  ee). \* indica el grupo en el que hubo diferencia. AG: grupo anti GnRH; AGhCG: grupo anti GnRH+hCG; C: grupo control. \_\_\_\_\_ 45

**Figura 12.1** Concentración promedio de eCG (media  $\pm$  ee) de los tres grupos de estudio en yeguas con gestación equina entre los 35 y 84 días de gestación. El área sombreada indica el periodo de tratamiento con el antagonista de GnRH que recibieron las yeguas dentro de los grupos experimentales. \_\_\_\_\_ 46

<b>Figura 12.2</b> Concentración de eCG por grupo experimental. No hubo diferencia significativa entre grupos ( $p>0.05$ ). AG: grupo anti GnRH; AGhCG: grupo anti GnRH+hCG; C: grupo control.	47
<b>Figura 13.1</b> Concentración de estradiol (media $\pm$ ee) en yeguas con gestación equina entre los 35 y 84 días de gestación. El área sombreada indica el periodo de tratamiento con el antagonista de GnRH que recibieron las yeguas dentro de los grupos experimentales.	47
<b>Figura 13.2</b> Concentración de estradiol por grupo de estudio (media $\pm$ ee). * indican los grupos en los que hubo diferencia. AG: grupo anti GnRH; AGhCG: grupo anti GnRH+hCG; C: grupo control.	48
<b>Figura 13.3</b> Concentración de P4, eCG y E2 (media $\pm$ ee) por grupo de estudio entre los días 35 a 84 de gestación. El área sombreada indica el periodo de tratamiento con el antagonista de GnRH que recibieron las yeguas dentro de los grupos experimentales. * indica la semana en la que hubo diferencia significativa. AG: grupo anti GnRH; AGhCG: grupo anti GnRH+hCG; C: grupo control.	50
<b>Figura 14.1</b> Concentraciones de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina que recibió tratamiento con un antagonista de GnRH y en la cual se aspiró el primer folículo anovulatorio hemorrágico.	52
<b>Figura 14.2</b> Concentración hormonal en una yegua con gestación equina, en la cual se aspiró el segundo folículo anovulatorio hemorrágico.	53
<b>Figura 14.3</b> Concentraciones de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina que recibió tratamiento con un antagonista de GnRH y en la cual se aspiró el tercer folículo anovulatorio hemorrágico.	54
<b>Figura 15.1</b> Concentraciones de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina que recibió tratamiento con un antagonista de GnRH.	56
<b>Figura 15.2</b> Concentraciones de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina que recibió tratamiento con un antagonista de GnRH.	57
<b>Figura 15.3</b> Concentraciones de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina que recibió tratamiento con un antagonista de GnRH.	59
<b>Figura 16.1</b> Concentraciones de progesterona, eCG y estradiol.	61
<b>Figura 16.2</b> Concentraciones de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina.	62

<b>Figura 16.3</b> Concentraciones de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina.	63
<b>Figura 16.4</b> Concentraciones de progesterona, eCG y estradiol	64
<b>Figura 17</b> Concentración intrafolicular de progesterona, estradiol, factor de crecimiento del endotelio vascular y prostaglandina F2 alfa en los tres grupos de estudio.	65
<b>Figura 18</b> Concentración de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina.	94
<b>Figura 19.1</b> Concentración de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina del grupo AG.	96
<b>Figura 19.2</b> Concentración de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina del grupo AG.	97
<b>Figura 19.3</b> Concentración de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina del grupo AG.	98
<b>Figura 19.4</b> Concentración de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina del grupo AG. El círculo hueco indica el momento en que se observó cambios en los folículos.	99
<b>Figura 20</b> Concentración de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina que formó solo un cuerpo lúteo suplementario.	100

## I. INTRODUCCIÓN

Los folículos anovulatorios hemorrágicos (FAH) son estructuras que resultan de la entrada de sangre a un folículo preovulatorio sin la consecuente ovulación y formación de un cuerpo lúteo típico (CL) (Ginther, 2006). El folículo anovulatorio incrementa su diámetro, se llena con partículas ecogénicas y eventualmente se luteiniza con una activa producción de P4 (Cuervo et al, 2012). Esta estructura ha sido encontrada en otras especies, incluyendo la mujer (Ginther et al, 2008).

El desarrollo folicular es un proceso continuo que culmina con la ovulación del folículo dominante, con atresia folicular (Savio et al., 1990) o con la formación de un folículo anovulatorio hemorrágico (FAH) (Cuervo-Aranjo, 2012). En el segundo caso, las oleadas foliculares formadas antes del día 30 de la gestación culminarán en atresia debido a la concentración insuficiente de LH para inducir la ovulación (Ginther, 1992; Allen, 1984) y el tercer caso constituye un problema económico y de manejo reproductivo (Ginther, 2006), aunado a ello, se ha demostrado repetitividad en las yeguas desde que se forma por primera vez pudiendo abarcar la mayoría de la época reproductiva, mostrando que se puede dar en diferentes ambientes hormonales (Ginther et al., 2008).

Los indicadores inminentes de la ovulación se pueden observar tanto en un folículo preovulatorio destinado a ovular como en uno destinado a convertirse en FAH (Ginther et al., 2006), por lo que, la predicción de la conversión de un folículo preovulatorio en un FAH es aún más difícil que la sola predicción de la ovulación, lo cual dificulta la investigación de su formación y las posibles opciones terapéuticas (Cuervo et al., 2012).

En la yegua, la gestación temprana se caracteriza por presentar concentraciones basales de la hormona luteinizante (LH) debido a la retroalimentación negativa que se ejerce por el aumento de progesterona (P4) proveniente de la estructura lútea formada después de la ovulación de un folículo preovulatorio. Sin embargo, la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) continúa con un patrón bimodal (Gigli, 2006), induciendo oleadas foliculares cada 10-12 días (Ginther-Bergfelt, 1962).

En las yeguas inseminadas con semen de caballo (gestaciones equinas), la concentración de P4 disminuye gradualmente entre el día 12-30 de la gestación y a partir del día 35 se elevan súbitamente debido a las ovulaciones secundarias y/o accesorias (Ginther, 1992; Bergfelt et al., 1989), éstas últimas como resultado de la luteinización de folículos dominantes en diferentes momentos de la gestación (Allen, 2001a; Boeta y Zarco 2005) que junto con la glándula lútea primaria mantendrán la secreción de P4 hasta el día 150-180 de la gestación (Squires et al., 1974a). La formación de las estructuras ya mencionadas se da por la presencia de la hormona gonadotropina coriónica equina (eCG) la cual tiene afinidad a los receptores a LH del cuerpo lúteo (Bousfield et al., 1987). La eCG es producida por las copas endometriales del cinturón coriónico del embrión, ésta va a ejercer un efecto luteotrópico y luteogénico a partir del día 35-40 al 120-150 de la gestación (días en los que se presentará el rechazo inmunológico de las copas por parte de la yegua (Boeta-Zarco, 2012; Allen, 2001).

Al evaluar el desarrollo folicular así como las concentraciones de estradiol y eCG durante y después del tratamiento con un antagonista de GnRH (D-Nal, D-Phe, D-Pal, 4, Phe, D-Hcit, 7, Lys (iPr), 9, D-Ala; Antarelix) en gestaciones equinas, se observó que tanto las concentraciones de eCG como el volumen intrafolicular y el desarrollo folicular no se vieron afectados por el tratamiento, sin embargo la ovulación y o luteinización de los folículos se vio alterada dando como resultado folículos anovulatorios hemorrágicos, sugiriendo que la eCG puede mantener el desarrollo folicular pero no es capaz por sí misma de inducir la ovulación como lo haría la LH hipofisiaria (Costilla, 2011).

La demostración de que la administración de un antagonista de GnRH a yeguas gestantes permite inducir en forma predecible la formación de folículos anovulatorios hemorrágicos, permite tener un modelo para el estudio de la fisiología y endocrinología de dichas estructuras que permita avanzar en el conocimiento de las causas en la formación de este tipo de folículos.

## **II. OBJETIVOS**

- a) Estudiar la falla en la ovulación de folículos preovulatorios inducida por la supresión de la secreción de LH hipofisiaria en yeguas gestantes.
- b) Caracterizar morfológicamente el desarrollo y permanencia de folículos anovulatorios hemorrágicos así como las características de su flujo sanguíneo mediante la ecografía doppler a color.
- c) Determinar si la administración de hCG en folículos de 35-37 mm de diámetro evita la formación de folículos anovulatorios hemorrágicos en yeguas gestantes a las que se les ha suprimido la secreción endógena de LH mediante la administración de un antagonista de GnRH.
- d) Comparar las concentraciones plasmáticas de progesterona, estradiol y eCG en yeguas tratadas con un antagonista de GnRH o con un antagonista de GnRH más hCG.
- e) Estudiar la endocrinología de los folículos anovulatorios hemorrágicos a través de la determinación de la concentración de progesterona, estradiol, PGFM y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en el líquido de los folículos anovulatorios hemorrágicos y su comparación con el líquido de folículos preovulatorios normales.
- f) Relacionar los cambios morfológicos de los folículos anovulatorios hemorrágicos con las concentraciones hormonales presentes en dichos folículos.

## **III. HIPÓTESIS**

La administración de un antagonista de GnRH inducirá falla en la ovulación en yeguas gestantes mediante la alteración en la secreción de hormonas esteroides, prostaglandinas y VEGF, las cuales pueden relacionarse con anomalías en el desarrollo del folículo.

## IV. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### A. GnRH

#### 1. Mecanismo de acción

La GnRH es una hormona deca péptida producida en el hipotálamo, se almacena en la eminencia media y es secretada, hasta que se produce la despolarización neuronal, hacia la hipófisis a través de capilares fenestrados y vasos portales (Alexander, 1993).

Las neuronas productoras de GnRH se originan en el bulbo olfatorio y durante el desarrollo migran al encéfalo a través del primer par craneano hasta ubicarse en la región hipotalámica (Conn, 2000). En dicha región, un grupo de 500-1000 neuronas se organizan en un centro pulsátil, cada neurona tiene pulsatilidad intrínseca propia, las cuales están intercomunicadas para liberar sincrónicamente GnRH a la circulación portal. Está regulada por la secreción endógena de diversas hormonas entre ellas la melatonina la cual es liberada por estímulo de la oscuridad. Por lo tanto, la cantidad de horas luz influye en la secreción de GnRH en las especies fotoperiódicas. La especie equina se considera como fotoperiódica positiva ya que el aumento de las horas luz, en forma natural o artificial, produce una disminución en la liberación de la melatonina, permitiendo la liberación de la GnRH y estimulando la biosíntesis de FSH y LH (Gigli, 2006)

#### 2. Receptores para GnRH

El receptor para GnRH (GnRH-R) es de membrana y está conformado por siete dominios transmembranales acoplados a proteína G. El primer receptor hallado, GnRH I-R, carece de la región carboxilo terminal intracitoplasmática y su tercer plegamiento intracelular es relativamente corto. Ambas características son importantes para la internalización y desensibilización de los receptores que emplean la proteína G. Se identificaron más variantes de los receptores en vertebrados que difieren en el tercer plegamiento extracelular y el extremo intracelular. El número de GnRH-R en la hipófisis aumenta antes del pico preovulatorio de gonadotropinas y luego decrece (Wang, 2001; Brothers, 2002; Neill, 2002).

La hormona tiene efecto sobre su propio receptor, por lo cual dependerá de la concentración y frecuencia de pulsos de GnRH que lleguen a los receptores para su propia secreción. La respuesta secretora es mayor ante un segundo pulso de GnRH que ante el primero. A esto se le llama self-priming o autopotenciación. A cantidades fisiológicas del péptido, se observa inicialmente una disminución en el número de receptores (regulación a la baja), con menor respuesta del gonadotropo. Después hay una segunda fase en la que aumenta el número de receptores (regulación a la alta), pero que no implica mayor sensibilidad del gonadotropo, debido a que los gonadotropos responden cerca de su máxima secreción, con sólo 20% de los receptores ocupados (Wang, 2001; Brothers, 2002; Neill, 2002).

Concentraciones pequeñas de la hormona estimulan la síntesis del receptor y lo mantiene a niveles fisiológicos, en cambio en concentraciones altas y constantes provocan la disminución de los receptores (regulación a la baja) y desensibilización por la internalización del receptor y modificaciones en los segundos mensajeros (Wang, 2001; Brothers, 2002; Neill, 2002).

### 3. Segundos mensajeros de GnRH

Al unirse la GnRH a su receptor induce un cambio conformacional en la proteína Gq, activa la fosfolipasa C y la hidrólisis del fosfatidilinositol en inositoltrifosfato y diacilglicerol, que activan la proteinquinasa C y movilizan el calcio intracelular y el ingresado desde el medio extracelular por medio de la apertura de canales (Kraus, 2001). La GnRH puede acoplarse a proteínas Gi y Gs, inhibiendo o estimulando la adenilato ciclasa, además de activar otras fosfolipasas, la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la vía de la tirosin quinasa (Kraus, 2001).

### 4. Análogos de GnRH

Se han desarrollado análogos de GnRH sustituyendo uno o varios aminoácidos que son administrados por vía endovenosa, intramuscular, subcutánea o por vía nasal. El uso clínico de los análogos de GnRH ha sido para inducir la liberación de LH y la ovulación, para provocar hipogonadismo hipogonadotrópico en tumores

gonadodependientes, endometriosis, pubertad precoz, como medio de diagnóstico en alteraciones de la secreción gonadotrófica de origen hipofisiario de otro extrahipofisiario. Con los análogos se buscan ventajas como la de larga duración, mayor afinidad por el receptor que la hormona endógena y mayor tiempo de unión. En una primera fase, al análogo se une al receptor y descarga FSH y LH pero después de agotarse el gonadotropo y permanecer unido al receptor, evita la acción del GnRH endógeno y lleva a la hiposecreción gonadotrófica, el mecanismo que está implicado es de “regulación a la baja” y desensibilización (Huirne, 2001; Elter, 2001; Broqua, 2002).

Los antagonistas de GnRH actúan de manera competitiva pero el efecto es reversible. Se unen al receptor GnRH-R y bloquean su interacción con la hormona endógena. El bloqueo de los receptores de GnRH disminuyen la secreción de FSH y LH (Huirne, 2001; Elter, 2001; Broqua, 2002).

Las primeras generaciones de antagonistas como el Detirilex tenían alta actividad antagonista pero promovían la liberación de histamina. Posteriormente se crearon antagonistas sin dicho efecto como Abarelix, Antarelix, Cetrorelix, Genirelix e lturelix (Huirne, 2001; Elter, 2001; Broqua, 2002).

El descenso de las gonadotropinas es menos drástico para la FSH, sugiriendo la coexistencia de otro mecanismo regulador para esta hormona (Huirne, 2001; Elter, 2001; Broqua, 2002). El tratamiento con antagonistas de GnRH produce la disminución en la secreción de progesterona pero no luteólisis completa (Wang, 2004).

## B. HORMONAS GONADOTRÓPICAS

La hormona foliculoestimulante (FSH) y la luteinizante (LH) son glicoproteínas producidas por la hipófisis. Están formadas por la unión de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  es específica para cada especie y es idéntica en las otras hormonas glicoproteicas. La subunidad  $\beta$  determina la función biológica (Gigli, 2006).

### 1. Hormona foliculoestimulante (FSH)

Es necesaria para el reclutamiento de folículos antrales. Estimula a las células de la teca interna para la producción de andrógenos y a la activación de la enzima aromatasa en las células de la granulosa para transformar los andrógenos en estradiol. También está involucrada en el aumento de la vascularización del folículo dominante para permitir una mayor obtención de nutrientes (Gigli, 2006).

La FSH estimula el surgimiento de la oleada folicular y alcanza su máxima concentración cuando el folículo más grande alcanza aproximadamente 13 mm de diámetro (Ginther *et al.*, 2000; Ginther *et al.*, 2004). La disminución de FSH es necesaria para la desviación; hay un intervalo de tres días entre el pico en la concentración de FSH y el inicio de la desviación. Durante este periodo, todos los folículos requieren aún la secreción de FSH sin embargo, al estar secretando estrógenos e inhibina contribuyen a la propia disminución en la liberación de FSH desde la hipófisis. Los folículos más grandes se vuelven más sensibles a la FSH que los folículos pequeños (Ginther *et al.*, 2001; Ginther *et al.*, 2003) de manera que contribuye al desarrollo del folículo dominante después de la desviación.

La FSH promueve la proliferación de las células de la granulosa y aumenta el tamaño folicular, junto con el estradiol, estimula la formación de cavidad antral y la expresión de receptores a LH en las células de la granulosa. En el momento de la ovulación, estimula la secreción del activador del plasminógeno por parte de las células de la granulosa. En la yegua, la secreción puede ser uni o bimodal. El patrón bimodal se observa solamente en el periodo de transición de primavera, durante este periodo su concentración en plasma tiene un primer pico al final del

estro y un segundo pico en la mitad del diestro; mientras que durante la temporada ovulatoria se mantiene solo el patrón unimodal (Alexander, 1993).

## 2. Hormona luteinizante (LH)

La LH reinicia la meiosis en el ovocito del folículo preovulatorio, desencadena la ovulación y controla el desarrollo y mantenimiento del CL. Actúa a través de receptores de membrana de células de la granulosa, adquiridos antes del inicio de la desviación (Goudet *et al.*,1999), y de la teca del folículo preovulatorio, de manera que produce un aumento de AMPc vía adenilato ciclasa, estimulando la conversión de colesterol en pregnenolona para desencadenar lo eventos de la ovulación (Gigli, 2006) y la producción de progesterona.

La LH en la yegua posee más carbohidratos y ácido siálico que otras especies. Al medir la hormona periféricamente no se observan los pulsos de liberación debido a su vida media alta y a que se libera de forma tónica y pulsátil. Su concentración es baja durante la mitad de la fase lútea, aumenta pocos días antes del estro, durante el decline de la FSH, y alcanza su mayor concentración en el plasma generalmente un día después de la ovulación (Gigli, 2006).

## C. FOLICULOGÉNESIS

La foliculogénesis es el proceso de formación, crecimiento y diferenciación folicular que abarca desde el folículo primordial hasta el folículo preovulatorio (Gigli *et al.*, 2006). Según las características histológicas de los folículos se clasifican en: primordiales, primarios, secundarios, terciarios o antrales y preovulatorios.

Se denomina folículo primordial a la estructura que contiene al ovocito primario detenido en la profase de la primera división meiótica (diploteno) rodeado por una capa de células de la granulosa planas (Gigli, 2006). Estos folículos corresponden a la reserva gametogénica, la cual está calculada entre unos 36,000 a 46,000 folículos primordiales que utilizará la yegua en toda su vida reproductiva. El folículo primario se forma cuando las células planas de la granulosa, antes de comenzar a dividirse por mitosis, se diferencian en una capa de células de forma cúbica que rodean al ovocito primario (Hirshfield, 1991; Gigli, 2006). En esta

etapa, el ovocito es rodeado por una capa de glicoproteínas denominada zona pelúcida. Las células de la teca interna comienzan a rodear a las de células de la granulosa, las cuales aumentan en número y tamaño. El folículo secundario se forma cuando el ovocito primario está rodeado por varias capas de células de la granulosa. Las células tecales se diferencian en una capa externa y otra interna rodeando a las células de la granulosa. Hasta este estadio los folículos se clasifican como preantrales debido a que aún no se ha formado la cavidad antral. Los folículos terciarios o antrales se caracterizan histológicamente por la presencia de la cavidad antral y por estar rodeados de varias capas cúbicas de células de la granulosa que comienzan a secretar líquido folicular, que al acumularse produce un reordenamiento de las mismas células del cúmulo y murales (Gigli *et al.*, 2006). A nivel molecular se caracterizan por una mayor expresión de receptores para FSH en las células de la granulosa y para LH en las células de la teca las cuales van a estar constituidas por tejido conectivo (teca interna) y por una capa de colágeno atravesada por capilares (teca externa). Finalmente, los folículos preovulatorios son considerados aquellos de diámetro mayor a 35 mm (Ginther, 1992) y que desde su caracterización como dominantes además de expresar receptores a FSH en las células de la granulosa también los expresaron para LH (Gigli *et al.*, 2006).

#### D. DINÁMICA FOLICULAR

La dinámica folicular consta de tres etapas: reclutamiento, selección y dominancia. El reclutamiento folicular, a su vez, se subdivide en dos etapas:

- 1) Activación inicial: comienza antes de la pubertad (Mc Gee-Hsueh, 2000), abarca desde el folículo primordial hasta el folículo terciario (Gigli, 2006), como se mencionó anteriormente es un proceso gonadotrópico independiente. Aunque se desconocen los factores o mecanismos que promueven que los folículos primordiales abandonen la reserva e inicien su activación, crecimiento y desarrollo, se ha considerado que están involucrados diferentes elementos como el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9), la proteína morfogénica ósea (BMP15) y la

hormona inhibidora de los conductos de Müller (AMH) (Durlinger *et al.*, 2002; Juengel *et al.*, 2004).

2) Activación de folículos antrales: inicia después de la pubertad y requiere de niveles elevados de FSH. A la revisión ultrasonográfica se pueden encontrar folículos que miden desde 6 mm de diámetro (Ginther *et al.*, 2001).

Durante la selección están presentes, en el ovario, de 7 a 11 folículos con un diámetro entre 5-6 mm, los cuales continúan un crecimiento común bajo el estímulo de FSH (Ginther *et al.*, 2001) durante aproximadamente 6 días (Ginther *et al.*, 2004). Cuando el folículo más desarrollado alcanza un diámetro de 13 mm su secreción de inhibina y estradiol es suficiente para inducir la disminución de las concentraciones de FSH. En este momento se produce la selección del folículo dominante, el cual tendrá gran capacidad de producción de estradiol y mayor sensibilidad a la LH y FSH. En promedio, el futuro folículo dominante emerge un día antes que los otros folículos de la oleada, esta emergencia temprana resulta en un diámetro ventajoso para el futuro folículo dominante (Gastal *et al.*, 2004; Ginther *et al.*, 2004). Los folículos continuarán creciendo de 2-3 mm por día (Bergfelt-Adams, 2007) hasta el momento de la desviación en la cual el diámetro del futuro folículo dominante alcanza de 20-25 mm y el subordinado 19 mm (Bergfelt-Adams, 2007; Watson *et al.*, 2002). El folículo subordinado puede mantener su viabilidad por un día o más después del inicio de la desviación así puede ser rescatado para convertirse en dominante si el dominante falla o es abatido (Ginther *et al.*, 2003; Ginther *et al.*, 2004).

Finalmente, la dominancia consiste en que el folículo seleccionado dominante continúa creciendo hasta ovular, atresarse o formar un folículo anovulatorio hemorrágico; mientras los otros subordinados regresan y se atresian (Gigli, 2006).

## E. ATRESIA FOLICULAR

La atresia es un proceso degenerativo, paulatino e irreversible del folículo, con lo cual pierde su integridad y funcionalidad (Shama, 2000; Chedrese, 2003)

La atresia es el destino de la gran mayoría de los folículos (Rosado *et al.*, 1991), se presenta en cualquier estadio del desarrollo folicular aunque es más frecuente en folículos antrales, está directamente relacionada con el tamaño de los folículos ya que los más grandes presentan un índice proliferativo mayor, que hace a sus células más susceptibles a la muerte por apoptosis y por lo tanto a la atresia (Quirk *et al.*, 2004).

En la atresia, destacan algunos cambios morfológicos e histológicos, como son: núcleos picnóticos y fragmentación nuclear en las células de la granulosa, desprendimiento de éstas mismas por la pérdida de la matriz intercelular, desprendimiento de complejo cumulus-ovocito y en algunos casos hipertrofia de las células de la teca (Shama, 2000).

El adecuado desarrollo del folículo depende de la presencia de factores que promuevan el crecimiento del folículo y lo protejan de la apoptosis, como son el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y hormonas como el estradiol, LH y FSH. En ausencia de éstos se activa la vía de la apoptosis endógena (acción directa sobre la mitocondria) en el folículo, y se da paso a la atresia folicular ( Quirk *et al.*, 2004).

## F. PRODUCCIÓN FOLICULAR DE ESTRADIOL

Las células de la teca interna y de la granulosa actúan en forma conjunta para lograr la síntesis de estradiol (regulación parácrina) de manera que, las células de la teca producen andrógenos a partir de colesterol por estímulo de la LH, estos andrógenos se difunden a las células de la granulosa las cuales, por efecto de la FSH, producen un aumento en la enzima aromatasa, quien finalmente convierte a los andrógenos en estradiol (Gigli, 2006). Consecuentemente, la liberación folicular de estradiol y de inhibina ira suprimiendo la concentración circulante de FSH. El estradiol se verá incrementado, aproximadamente, un día antes de la

desviación y se mantendrá elevado uno o dos días antes de la ovulación (Bergfelt *et al.*, 2001) y la concentración de inhibina incrementará antes que el estradiol, previo al inicio del decline de la FSH (Ginther *et al.*, 2004; Bergfelt *et al.*, 2001; Irvine *et al.*, 2000; Donadeu *et al.*, 2001). Después de la desviación, la inhibina se mantendrá elevada por acción del folículo dominante (Raz *et al.*, 2012). Finalmente, en el momento de la ovulación, la LH producirá un aumento en la secreción de progesterona al producir un cambio en la esteroidogénesis, el colesterol comenzará a convertirse en pregnenolona en lugar de estradiol (Tsafiri, 1996).

## G. HORMONAS INTRAFOLICULARES DURANTE LA DESVIACIÓN FOLICULAR

### 1. IGF

Los IGFs funcionan como moduladores de la acción de las gonadotropinas a nivel celular. Poco después de la selección folicular, el folículo dominante tiene una actividad proteolítica inducida por FSH. De este modo, se observa que los folículos dominantes adquieren la capacidad de separar los IGFs, mediante proteasas como la proteína plasmática-A asociada con la preñez (PAPP-A) que degrada a las IGFbps (Spicer, 2004) que liberan IGF para la sinergia con FSH y estimular la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa y de la teca así como el crecimiento celular, aumento de sensibilidad, producción de estradiol y progesterona de las células de la granulosa (Monget, 1995). La actividad y biodisponibilidad de los IGFs está modulada por las IGFbps, a través de su unión a los IGFs y evitan que se unan a sus receptores. (Armstrong, 1997).

En yeguas, el incremento en IGF-1 es el primer cambio observado antes de la desviación. El sistema IGF incluye IGF-I e IGF-II, proteínas de unión a IGF (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5, -6) y proteasa de IGFBPS (Spicer, 2004). El IGF-I libre estimula la proliferación de la granulosa y tiene sinergia con las gonadotropinas para promover la diferenciación de las células foliculares (Spicer, 1995).

La concentración de IGF-I libre, estradiol, inhibina-A, activina-A es mayor en el futuro folículo dominante que en otros folículos antes del inicio de la desviación en equinos.

## 2. VEGF

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) estimula la mitosis de las células endoteliales, incrementa la permeabilidad vascular y la angiogénesis (Reynolds, 1998). La angiogénesis fisiológica se caracteriza básicamente por un proceso gradual y progresivo (Conway *et al.*, 2001; Jousen *et al.*, 2003): (i) dilatación de vasos pre-existentes, incrementa la permeabilidad vascular y la degradación de la matriz extracelular y la lámina basal (Conway *et al.*, 2001; Jousen *et al.*, 2003) por proteasas producidas por la célula endotelial (Jussila y Alitalo, 2002); (ii) proliferación y migración de células endoteliales (Conway *et al.*, 2001; Jousen *et al.*, 2003) hacia el lugar donde se desarrollará el nuevo vaso sanguíneo; (iii) en la sección media del vaso en formación, las células endoteliales proliferan y se ensamblan para formar el lumen del vaso sanguíneo, el nuevo vaso sufre anastomosis con el vaso adyacente para ser perfundido con circulación sanguínea (Jussila y Alitalo, 2002; Risau, 1997; Abulafia y Sherer, 2000). Hasta este punto, el capilar recientemente formado, es frágil y puede ser remodelado; (iv) La maduración del nuevo vaso sanguíneo hacia un vaso estable y funcional requiere que (Jussila y Alitalo, 2002) los nuevos vasos formados sean rodeados por células peri-endoteliales, se reorganiza la matriz extracelular y la lámina basal y (v) estabilización de los vasos por la transición a un fase de quiescencia (Conway *et al.*, 2001; Jousen *et al.*, 2003).

El VEGF parece tener tres formas de participación en el desarrollo vascular normal, primero es capaz de iniciar la angiogénesis promoviendo la proliferación y quimiotaxis de las células endoteliales (Reynolds y Redmer, 1998). Segundo, mantiene la viabilidad de vasos sanguíneos inmaduros y tercero, facilita el recubrimiento de los vasos con pericitos. Participa en la supervivencia de las células endoteliales induciendo la expresión de proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2 y A1 (Gerber *et al.*, 1998). El VEGF es un potente mitógeno de células

endoteliales, tiene una actividad mitótica en neuronas (Jussila y Alitalo, 2002; Petrova *et al.*, 1999) y actividad citoprotectora en las células de la granulosa (Greenaway *et al.*, 2004).

La familia de proteínas de VEGF, incluyen al VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD y el factor de crecimiento placentario (PLGF) (Redmer *et al.*, 2001). La actividad biológica del VEGF está mediada principalmente por dos receptores tipo tirosina cinasa: el VEGFR1 y el VEGFR2, ambos se caracterizan por tener siete dominios extracelulares de unión similares a inmunoglobulinas, una sola región transmembranal y un dominio tirosina cinasa intracelular (Redmer *et al.*, 2001; Berisha *et al.*, 2000). Se considera que el VEGFR2 es el mayor mediador de los efectos mitogénicos, angiogénicos y de permeabilidad de VEGF (Ferrara, 2004). A la unión de VEGF con VEGFR1 también se le han atribuido efectos proliferativos (Zeng *et al.*, 2001), quimiotácticos y de protección de células endoteliales (Ferrara, 2004), aunque por su limitada capacidad de señalización, es generalmente considerado un receptor “anzuelo” (Zeng *et al.*, 2001).

El VEGFR1 puede regular la angiogénesis haciendo poco disponible el ligando para su unión con VEGFR2 (Zeng *et al.*, 2001). Adicionalmente, por corte y empalme de los RNAm inmaduros de VEGFR1 y VEGFR2, se producen formas solubles de ambos receptores (sVEGF-R1 y sVEGFR2), las proteínas de estos receptores pierden el dominio transmembranal e intracelular con lo cual no pueden traducir señales, sin embargo, mantienen los dominios de unión al ligando conservando la misma afinidad por VEGF que los receptores de membrana (Robinson y Stringer, 2001). Se sugiere que existe una competencia por el ligando entre los receptores solubles y los de membrana, que les confiere a los primeros un efecto anti-angiogénico (Sallinen *et al.*, 2009).

La hipoxia y la hipoglicemia son los mayores estimuladores de la expresión de VEGF (Shweiki *et al.*, 1992). La transcripción del RNAm de VEGF inducida por hipoxia es aparentemente mediada, al menos en parte, por la unión del factor de inducción de hipoxia 1 (HIF1) a un sitio de unión para HIF1 localizado en el promotor de VEGF (Levy *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995).

En el ovario, la formación de nuevos vasos sanguíneos facilita la transferencia de hormonas, oxígeno y nutrientes hasta las células del folículo que lo demanden (Fraser *et al.*, 2000), además permite la liberación de hormonas foliculares a la circulación (Watson y Al-zi'abi, 2002). En el estado antral de los folículos, la capa vascular está formada por dos redes concéntricas de vasos sanguíneos, una de ellas ubicada directamente por fuera de la membrana basal y la otra en la teca externa (Martelli *et al.*, 2006).

La concentración de VEGF en el líquido folicular es más alta en el folículo dominante que en el subordinado un día antes del inicio de la desviación (Gastal, 1999; Ginther, 2004). El incremento en la vascularidad puede darle al folículo una ventaja para recibir un suplemento preferencial de factores de crecimiento, gonadotropinas, precursores de esteroides y otros nutrientes requeridos para continuar su desarrollo (Raz, 2012). Durante el periodo peri-ovulatorio los vasos de la teca interna están notablemente dilatados e hiperémicos. Además, una distintiva activación de células endoteliales puede detectarse (Conway *et al.*, 2001; Jousen *et al.*, 2003; Fam *et al.*, 2003). Las células de la granulosa, teca interna, células lúteas y endoteliales muestran una fuerte expresión de VEGF A y VEGFR2 durante el periodo peri-ovulatorio (Müller *et al.*, 2009). La expresión simultánea de estos factores y receptores coinciden con la pronunciada angiogénesis en este momento (Hanahan, 1997). La presencia de VEGFR2 en células de la granulosa, sugiere un efecto autocrino de VEGF. En células de la granulosa de folículos seleccionados, la expresión de VEGFR2 se incrementa en relación con las células de folículos no seleccionados, mientras que la expresión de VEGFR1 no cambia entre tipo de folículos. En folículos dominantes de bovino, se demostró que la proteína de VEGF está en mayor concentración en la granulosa que en la teca, sin embargo, VEGFR1 se encuentra en mayor concentración en células de la teca que en células de la granulosa, lo cual sugiere que este receptor, considerado como anzuelo, podría atraer a VEGF desde la granulosa hacia la teca (Pinzón *et al.*, 2010). El origen de la vascularización lútea en el ovario de la yegua está localizado principalmente en la teca interna (Watson y AL-zi'abi, 2002).

## H. PROSTAGLANDINAS Y TROMBOXANOS

Son ácidos grasos derivados del ácido araquidónico. Intervienen en el proceso de ovulación. Tanto PGF<sub>2</sub> $\alpha$  y PGE<sub>2</sub> intervienen en la ruptura de la pared folicular a través de la liberación de enzimas contenidas en los lisosomas y en cambios vasculares. Los tromboxanos tiene un efecto antagónico al producido por las prostaglandinas a nivel vascular para que la ovulación sea un proceso autocontrolado (Tsafriri, 1996). Los cambios vasculares comprenden un aumento en el flujo sanguíneo como respuesta al aumento de las prostaglandinas y el sistema renina-angiotensina y una disminución en la resistencia vascular por bradiquininas y radicales libres de oxígeno, llevando a una hiperemia (Tsafriri, 1996).

## I. MECANISMO DE LA OVULACIÓN

Conforme el folículo dominante continúa creciendo, las concentraciones de estradiol aumentan estimulando la secreción pulsátil de GnRH para desencadenar la oleada de LH y la consecuente ovulación (Ginther *et al.*, 2006). La oleada de LH induce en las células de la granulosa un aumento del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), también estimula la producción de histamina y prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), que favorece la producción de factores angiogénicos con la finalidad de asegurar el abastecimiento hormonal adecuado del folículo para su maduración final (Senger, 2003).

Se han descrito tres mecanismos para explicar el proceso de la ovulación: 1) presión intrafolicular, 2) contracción muscular y 3) mecanismo bioquímico. El mecanismo bioquímico explica este proceso a través de la acción de las enzimas proteolíticas y los cambios vasculares promovidos por la secreción de LH. Con ella se da la activación del plasminógeno con el consecuente aumento de la plasmina, tanto en la teca como en la granulosa, que promueve la conversión de la procologenasa en colagenasa la cual ejercerá su función sobre las células de la teca externa, formada de colágeno, disminuyendo así la tensión de la pared folicular, dicho sitio corresponde al área apical del folículo, observada al ultrasonido (Gigli, 2006).

## J. FUNCIÓN Y REGULACIÓN DEL CUERPO LÚTEO

El pico de LH desencadena poco antes de la ovulación el reinicio de la meiosis del ovocito y la luteinización de las células foliculares. Las células de la granulosa se diferencian a células lúteas grandes (LLC) (Niswender *et al.*, 2000), capaces de producir progesterona, lo cual ocurre por el incremento en la expresión de enzimas que convierten el colesterol a P4 (P450ssc y 3 $\beta$ -HSD) y el decremento en la expresión de las que convierten progesterona a estrógenos (P450-17- $\alpha$  y P450 arom) (Bao y Garverick, 1998).

Después de la ovulación, la cavidad antral se llena de sangre, razón por la cual a la estructura se le denomina cuerpo hemorrágico, las células lúteas pequeñas, fibroblastos y células endoteliales proliferan y las células lúteas grandes duplican su tamaño sin modificar su número, hasta formar una masa compacta de células a la que se le denomina cuerpo lúteo. En la yegua el desarrollo del cuerpo lúteo abarca desde el día 0 al 5 post-ovulación. A las 10-12 horas pos-ovulación el CL de la yegua ya produce altas concentraciones de progesterona (Wang, 2004).

Durante su formación, el CL tiene una gran demanda metabólica debido a la elevada tasa de crecimiento la cual implica un gran desarrollo de vasos sanguíneos para satisfacer sus necesidades de oxígeno y nutrientes. Para esto, el VEGF y sus receptores, juegan un papel fundamental en la formación de vasos sanguíneos que le permite al CL cubrir sus demandas (Alonso-Pozos *et al.*, 2006). La alta afinidad de los receptores de LH de las células lúteas, permiten que el CL se mantenga activo pese a las concentraciones bajas de esta hormona durante el diestro. En la yegua este periodo abarca del día 5 al 14 pos-ovulación (Gigli, 2006).

En ausencia de señales embrionarias hacia la madre se produce la regresión del CL alrededor del día 14. El útero es el órgano que determina la regresión del CL a través de la secreción de prostaglandina F $2\alpha$  (PGF $2\alpha$ ). Debido a que la arteria ovárica en la yegua no se localiza en contacto directo con la pared de la vena útero-ovárica, la llegada de la PGF $2\alpha$  se realiza de forma sistémica. El efecto luteolítico de la PGF $2\alpha$ , ocurre principalmente por acción vaso constrictora sobre

el endotelio vascular que irriga al CL, como consecuencia habrá una menor llegada de nutrientes, oxígeno y colesterol necesarios para la esteroidogénesis (Niswender *et al.*, 2005). Los estrógenos ejercen un efecto positivo sobre el útero para liberar PGF2 $\alpha$  pero es necesario que la progesterona haya actuado previamente sobre las células endometriales. A diferencia de la vaca, el cuerpo lúteo de la yegua no produce oxitocina (Goff, 1987). El endometrio (Behrendt, 1997) sintetiza oxitocina, estimulando positivamente la secreción de PGF2 $\alpha$  (Vanderwall, 1998).

La regresión funcional del cuerpo lúteo involucra principalmente una reducción en la secreción de progesterona, mientras que la regresión estructural involucra alteraciones en la estructura celular de la glándula y una gradual involución dentro del ovario, para formar una pequeña cicatriz compuesta de tejido conectivo fibroso a la que se le denomina cuerpo albicans (Hussein, 2005).

#### K. GESTACIÓN TEMPRANA EN LA YEGUA

En la yegua, entre el día 6 y 7 de la gestación, el embrión pasará a través de la papila uterotubal, por la secreción de PGE2 la cual va a ejercer un efecto de relajación en las fibras musculares circulares lisas del oviducto, hacia el útero. El embrión desarrollará una cápsula resistente, formada por glicocalix entre los días 6.5 y 22 de la gestación, dicha estructura conferirá resistencia y elasticidad al embrión contra las contracciones miometriales además de ser la estructura que captará los nutrientes provenientes de la leche uterina para el desarrollo del embrión (Allen, 2001).

La gestación temprana se caracteriza por tener bajas concentraciones de LH por la retroalimentación negativa que ejerce la progesterona, sin embargo, la secreción de FSH continúa de manera bifásica y, durante los primeros días, hay oleadas foliculares cada 10-12 días (Gigli *et al.*, 2006; Ginther, 1992).

Entre el día 25-35 post-ovulación se desarrolla el cinturón coriónico en el embrión, cuyos pliegues aumentan en número y se proyectan hacia el interior de las vellosidades uterinas (Allen *et al.*, 1993). A partir del día 36-38 post-ovulación, las células del cinturón coriónico se desprenden para invadir el estroma endometrial y

formar las copas endometriales (Thway *et al.*, 2001) las cuales producirán altas concentraciones de gonadotropina coriónica equina (eCG) (Ginther *et al.*, 1992; Bergfelt *et al.*, 1989) desde el día 40 hasta el 150 de la gestación (Allen, 2001; Boeta y Zarco 2005) alcanzando su máxima capacidad secretora entre los días 60-70 de la gestación (Allen, 2001).

La eCG es una hormona glicoproteica cuya secuencia de aminoácidos de sus dos subunidades es idéntica a las subunidades de la LH equina (Bousfield, 1987). Ambas hormonas se unen al mismo receptor (LH / eCGr), sin embargo, la afinidad de eCG por el receptor es mucho más baja que la de LH debido a las diferencias en la glicosilación de ambas hormonas (Martinuk *et al.*, 1991). La alta concentración de eCG le confiere un papel potencial en el control de la fisiología ovárica (Murphy, 1991). La presencia de eCG durante la gestación tiene efecto luteogénico que conduce a la formación de cuerpos lúteos suplementarios, después del día 35 de la gestación como resultado de la ovulación y/o luteinización de folículos dominantes en diferentes momentos de la gestación (Allen, 2001a; Boeta y Zarco 2005) por las oleadas foliculares resultantes de los patrones de secreción de la FSH (Gigli *et al.*, 2006; Ginther, 1992). También, tiene efecto luteotrópico en el cuerpo lúteo primario el cual incrementa su secreción de progesterona después de iniciar el aumento de eCG (Allen, 1984; Boeta y Zarco 2005). Estos eventos se continúan hasta que las copas endometriales son rechazadas inmunológicamente entre el día 120 a 150 de la gestación (Bergfelt *et al.*, 1989).

El embrión equino secreta PGF2 $\alpha$  y PGE2 provocando contracciones y relajación del miometrio que le permite migrar libremente en el lumen uterino desde el día 8 post-ovulación hasta el día 16. De esta forma el embrión recorre de 10 a 20 veces por día el lumen uterino (Ginther, 1998; Griffin y Ginther, 1990). En el día 16 de la gestación, el embrión se fija cerca de la bifurcación uterina en uno de los cuernos debido al aumento en el tono miometrial y por el crecimiento de la vesícula embrionaria (Ealy *et al.*, 2009; Allen, 2001; Ginther, 2001). El recorrido del embrión por el lumen uterino además de constituir el reconocimiento materno de la

gestación, es un mecanismo luteostático ya que mantiene disminuidos los receptores a oxitocina entre los días 10 a los 16 de la gestación (Ealy *et al.*, 2010).

#### L. FOLÍCULOS ANOVULATORIOS HEMORRÁGICOS (FAHs)

Se conoce como folículo anovulatorio hemorrágico (FAH) a la estructura que resulta después de la entrada de sangre al antro folicular sin la subsecuente ovulación (Ginther *et al.*, 2006).

##### 1. Antecedentes

Esta estructura ha sido encontrada en otras especies, incluyendo la mujer, en la cual recibe el nombre de folículo anovulatorio luteinizado (LUF) (Ginther *et al.*, 2008). El LUF ha sido comúnmente usado en la medicina humana para referirse a una causa común de infertilidad en las mujeres la cual, se caracteriza por una falla en la ruptura y ovulación de su folículo preovulatorio a pesar de los cambios ovulatorios secundarios, tal como el pico de LH, el aumento en la P4 o la transformación secretora del endometrio. En lugar de la ovulación y la formación de un típico CL, el folículo anovulatorio incrementa su diámetro, se llena con partículas ecogénicas y eventualmente se luteiniza con una activa producción de P4 (Cuervo *et al.*, 2012).

##### 2. Incidencia

El FAH se ha observado tanto al inicio de la época reproductiva como al final, 5% y 20% respectivamente, así como en yeguas viejas, representando un problema económico y de manejo por la inversión realizada. Se ha demostrado repetitividad en las yeguas desde que se forma por primera vez pudiendo abarcar la mayoría de la época reproductiva, mostrando que se puede dar en diferentes ambientes hormonales (Ginther *et al.*, 2008).

##### 3. Etiología

El líquido folicular en las yeguas contiene un anticoagulante similar a la heparina (Stangroom y Weevers, 1962). Se ha sugerido que los cambios en el desarrollo

del FAH, observados a través del ultrasonido, se deben a la disminución de la efectividad de este anticoagulante en líquido folicular, aunque no ha sido demostrado.

#### 4. Hallazgos

Ginther et al (2006) compararon las características al ultrasonido y en cuanto a concentración hormonal entre un folículo pre-FAH y un folículo destinado a ovular, rescatando que: en el día -3, la concentración de E2 fue mayor en el folículo pre-FAH que en el folículo preovulatorio; del día -3 al 0, no hubo diferencia en el edema endometrial entre ambos tipos foliculares; en el día -1, los indicadores de la inminente ovulación fueron iguales en ambos folículos, el diámetro del folículo pre-FAH podía ser mayor o igual al folículo preovulatorio y que mientras el folículo pre-FAH mostró flujo sanguíneo en la pared del área apical el otro no lo presentó; en el día 3, las concentraciones de P4, LH y FSH también fueron iguales; finalmente del día 0-17 tampoco hubo diferencia en la concentración de P4 entre ambos tipos foliculares.

#### 5. Técnicas diagnósticas de FAHs

##### *a) Ultrasonografía modo B*

Las alteraciones que se observan en los FAHs, son las siguientes (Día 0 = día en que se debió presentar ovulación): 1) día -1, aparición de puntos ecogénicos en el antro folicular, los cuales exceden en cantidad a los esperados en un folículo preovulatorio normal, 2) engrosamiento de la granulosa, 3) día 1, formación de líneas ecogénicas, similares a cadenas, en el antro folicular, 4) día 1-2. Las líneas ecogénicas darán la formación de redes y 3) día 3, el folículo se tomará firme, esto es detectable mediante la presión con el transductor (Ginther *et al.*, 2006). El FAH falla en la ruptura folicular pero su diámetro continúa incrementando, observando que en el día 1 (Día 0 = día en que se debió presentar ovulación) puede tener un diámetro de 40 mm y al día 3 haber aumentado a 59 mm, así mismo se ha reportado que el FAH ha alcanzado hasta 80mm de diámetro, probablemente por

la continua entrada de sangre al folículo por una ruptura folicular incompleta. Posteriormente, la pared de FAH se espesa y se vuelve altamente ecogénica indicando la activa luteinización, esto demuestra la viabilidad del folículo antes de la formación del FAH (Ginther *et al.*, 2006; Cuervo *et al.*, 2012).

Los indicadores inminentes de la ovulación : disminución de la turgencia folicular, la pérdida de la forma esférica, la presencia de puntos ecogénicos en el antro folicular, el borde dentado de la granulosa y la formación de un área apical en la pared folicular que corresponde con el sitio de ovulación (Ginther *et al.*, 2006) se pueden observar tanto en un folículo preovulatorio destinado a ovular como en uno destinado a convertirse en FAH (Ginther *et al.*, 2006), por lo que, la predicción de la conversión de un folículo preovulatorio en un FAH es aún más difícil que la sola predicción de la ovulación, lo cual dificulta la investigación de su posible mecanismo patogénico y las opciones terapéuticas (Cuervo *et al.*, 2012).

#### *b) Ultrasonografía doppler a color*

El ultrasonido color-Doppler se ha utilizado para mostrar el flujo sanguíneo en los folículos preovulatorios y en los pre-HAF observando que es mucho mayor en el segundo que en el folículo preovulatorio (Ginther *et al.*, 2006)

Durante un examen Doppler es posible realizar una evaluación cualitativa o cuantitativa de vasos o tejidos específicos. La velocidad y dirección de los vasos sanguíneos puede ser representada por tipos e intensidades de pixeles de color o como una velocidad gráfica espectral (Ferreira *et al.*, 2011).

La vascularidad lútea es estimada por la revisión en movimiento lento y continuo del cuerpo lúteo completo (Ginther *et al.*, 2008). Puntos de color en la periferia y en el centro del CL deben incluirse en la estimación de la perfusión lútea (Ginther *et al.*, 2007). Una alternativa para validar el examen subjetivo del CL es determinar el número de pixeles de color capturados en una imagen que represente la sección más amplia del CL con áreas distintivamente coloreadas (Ginther *et al.*, 2004). En los folículos se estima considerando las señales de color de los vasos de la pared folicular (Siddiqui *et al.*, 2010). El folículo completo debe escanearse varias veces en un lento y continuo movimiento. Sin embargo, en caso de folículos

preovulatorios es imposible hacerlo así por sus dimensiones. En tales casos, la evaluación se hace por partes y se usa el promedio para estimar la vascularidad (Ferreira *et al.*, 2011).

*c) Obtención de líquido folicular para medición hormonal*

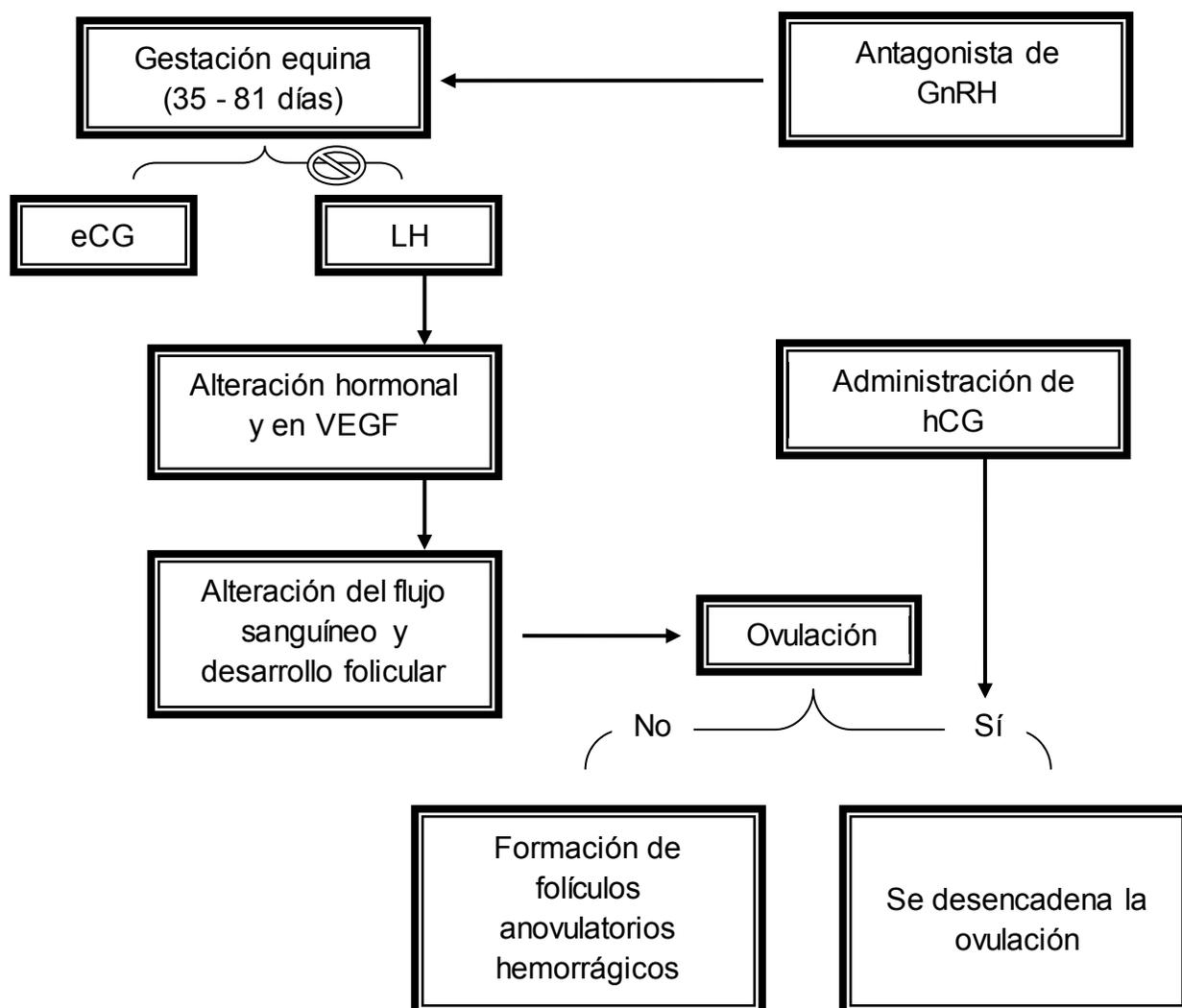
Alrededor del momento de ovulación existe una importante actividad angiogénica y las células germinales endoteliales crecen a partir de los capilares y venas de la teca, éstos pasan a través de la lámina propia hacia la granulosa y establecen un sistema vascular con un flujo sanguíneo importante (McClure *et al.*, 1993). El líquido folicular constituye el microambiente que nutre al ovocito y, como parte de la maduración del folículo, el volumen de líquido folicular, así como los niveles hormonales intrafoliculares aumentan (Tarlitzis *et al.*, 1993). El conocimiento y entendimiento de los aspectos intrafoliculares de la desviación se ha incrementado debido a los avances experimentales como el muestreo de líquido folicular (Evans, 1997; Mihm, 2000), la ablación folicular (Gastal, 2004) y la inyección de factores potencialmente estimuladores o inhibidores dentro de los folículos (Ginther, 2004). Se ha observado que la concentración intrafolicular de estradiol es uno de los parámetros más precisos para distinguir a los folículos sanos de los atrésicos, ya que los primeros presentan una cantidad mayor (Westergaard *et al.*, 1986; Seibel *et al.*, 1989).

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### A. MODELO CONCEPTUAL

En las yeguas se presenta una alteración en la actividad ovulatoria la cual involucra hemorragia dentro del antro del folículo preovulatorio y luteinización de la pared sin su previa ruptura. Dicha alteración es una condición anovulatoria normal que ocurre en yeguas con gestaciones tempranas, a pesar de sus altas concentraciones de eCG y niveles basales de LH. Por lo que se administró un antagonista de GnRH para inhibir en su totalidad la secreción de LH y ver el efecto aislado de la eCG. Al mismo tiempo se aplicó gonadotropina coriónica humana para inducir la ovulación.

Con base en la evidencia mencionada en el marco teórico, se propone el siguiente modelo conceptual.



## B. LOCALIZACIÓN

El presente estudio se realizó en el antiguo Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agrícola y Ganadera (CEIEPAG) de la FMVZ, ubicado en el kilómetro 2.5 de la carretera Chalco-Mixquic, Chalco, Estado de México.

## C. POBLACIÓN

Se utilizaron 10 yeguas gestantes, clínicamente sanas, con historial de 1-3 partos, un rango de edad entre 5-10 años y condición corporal entre 2.5-3.5 en escala de Martin-Rosset (1993). La alimentación de las yeguas fue a base de heno de avena y heno de alfalfa.

Como semental se empleó un caballo criollo de 10 años, clínicamente sano.

Para realizar el servicio lo más próximo a la ovulación, las yeguas fueron receladas diariamente, las que mostraron interés en el semental fueron monitoreadas diariamente mediante palpación y ultrasonografía para evaluar el desarrollo folicular y programar el servicio. Éste se llevó a cabo mediante inseminación artificial. Para la colección de semen se empleó una vagina artificial tipo Colorado y se realizó la inseminación transcervical con semen fresco sin diluir. El diagnóstico de gestación se realizó en el día 15 post-ovulación, en caso de que éste fuese negativo se volvió a inseminar a las yeguas que lo requerían.

## D. ULTRASONOGRAFÍA

A partir del diagnóstico de gestación, se monitoreó la viabilidad embrionaria cada tercer día (Ginther, 1986) verificando el latido cardiaco. La viabilidad fetal se confirmó mediante la detección del latido cardiaco y movimiento fetal.

Desde los primeros 30 días de gestación se llevó a cabo el seguimiento ultrasonográfico de crecimiento folicular y flujo sanguíneo por medio de un ultrasonido modo B y Doppler a color, dos veces por semana hasta que el diámetro folicular alcanzó 30 mm de diámetro, a partir de ese momento el seguimiento se realizó diariamente.

## E. TRATAMIENTO

A partir del día 35 de gestación, las 16 yeguas fueron divididas al azar en tres grupos: Grupo control (C) (n=4), Grupo anti-GnRH (AG) (n=3) y Grupo anti-GnRH+Hcg (AGhCG) (n=3).

El antagonista de GnRH utilizado fue Antarelix (D-Nal, D-Phe, D-Pal, 4, Phe, D-Hcit, 7, Lys (iPr), 9, D-Ala) a una dosis de 0.01 mg/kg IV diariamente por 7 días, posteriormente se aplicó semanalmente, vía subcutánea, a una dosis de 0.07 mg/kg durante 5 semanas (Costilla, 2012), a partir del día 35 de gestación.

En el grupo AGhCG, se monitoreó a la yegua por ultrasonografía y al momento de detectar un folículo de 35 mm de diámetro, 24 horas después, se administró hCG a dosis de 1500 UI IV.

## F. OBTENCIÓN DE LÍQUIDO FOLICULAR

Para la aspiración se empleó un ultrasonido de tiempo real con un transductor transvaginal.

- a) Grupo Control (4 yeguas): se realizó el seguimiento folicular ultrasonográfico por medio de un ultrasonido modo B y Doppler en yeguas de 35 días de gestación. Al detectar el desarrollo de un folículo preovulatorio (35 mm de diámetro) en una yegua se procedió a realizar la aspiración de líquido folicular por vía transvaginal; en otra hembra, la aspiración se realizó hasta encontrar el segundo folículo preovulatorio y en las últimas dos se hizo hasta que se encontró el tercer folículo preovulatorio.
- b) Grupo anti GnRH (3 yeguas): se realizó el seguimiento igual que con el grupo control de tal manera que al detectar el desarrollo de un folículo anovulatorio en cada yegua, por medio del ultrasonido Doppler a color, se procedió a la aspiración del líquido folicular.
- c) Grupo anti GnRH + hCG (3 yeguas): se realizó el seguimiento ultrasonográfico antes descrito de tal manera que al detectar un folículo preovulatorio, se administró hCG y a las 24 hrs post administración se procedió con la aspiración del líquido folicular.

#### G. MEDICIÓN DE PGFM, VEGF, E2 Y P4 EN LÍQUIDO FOLICULAR

En el líquido folicular obtenido por aspiración se determinaron las concentraciones de progesterona, estradiol, prostaglandina F2alfa y del factor de crecimiento del endotelio vascular. Las muestras se mantuvieron en congelación a -20°C hasta la determinación hormonal. Para la determinación de progesterona se utilizó un kit de radioinmunoensayo (RIA; TKPG-2, SIEMENS). El método mostró un coeficiente de variación intraensayo de 9.7% y una sensibilidad de 0.1-40 ng/ml. La medición de PGFM se realizó con un enzimoimmunoensayo de fase sólida (EIA kit; 516671, Cayman Chemical's ACE) cuyo coeficiente de variación intraensayo fue de 8.8% y la sensibilidad de 6.4 - 4,432.94 pg/ml. La determinación de VEGF fue por medio de un enzimoimmunoensayo (ELISA kit, 900-K10, PeptoTech) con un coeficiente de variación intraensayo de 12.8% y sensibilidad de 16 – 1,000 pg/ml. Finalmente, para la determinación de estradiol también se realizó un enzimoimmunoensayo empleando el anticuerpo de detección R4972 a una concentración de 1/20,000 donado por Coralie Munro de la Universidad de Davis, California y HRP a una concentración de 1/40,000, el ELISA se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Munro y Stabenfeld (1984). El coeficiente de variación intraensayo fue de 14% y la sensibilidad de 0.24–1001 pg/ml.

#### H. DETERMINACIÓN DE P4, E2 Y eCG EN SUERO

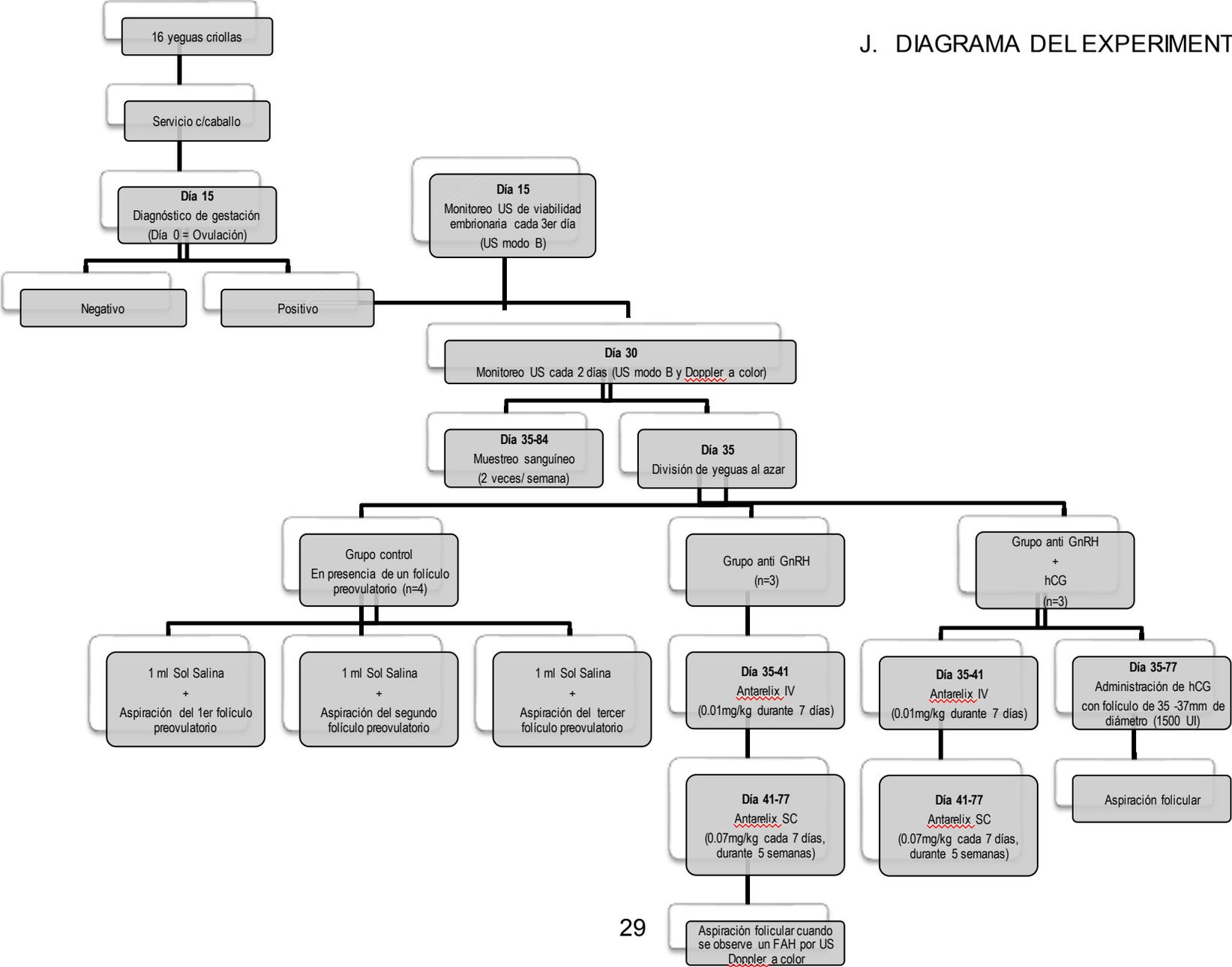
Se determinaron las concentraciones plasmáticas de eCG, progesterona y estradiol entre los días 35 y 81 de gestación. Para ello, a partir de la quinta semana de gestación se obtuvieron dos veces por semana muestras sanguíneas de cada yegua mediante punción yugular. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 10 minutos dentro de la primera hora posterior a su obtención para separar el plasma, el cual se mantuvo en congelación a -20°C hasta la determinación hormonal por radioinmunoensayo de progesterona (RIA; TKPG-2, SIEMENS) con coeficientes de variación intraensayo de 9.7% y una sensibilidad de 0.1-40 ng/ml; y por enzimoimmunoensayo de eCG (EIA-1298, DRG diagnostics). Para la determinación de estradiol también se realizó un

enzimoinmunoensayo empleando el anticuerpo de detección R4972 a una concentración de 1/20,000 donado por Coralie Munro de la Universidad de Davis, California y HRP a una concentración de 1/40,000, el ELISA se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Munro y Stabenfeld (1984). El coeficiente de variación intraensayo fue de 14% y la sensibilidad de 0.24–1001 pg/ml. Los coeficientes de variación para eCG intra e interensayo fueron de 3.2% y 7.3%, respectivamente, con una sensibilidad de 0.2-305 mUI/ml.

## I. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el objeto de evaluar el efecto de la administración de un antagonista de GnRH sobre la formación de folículos anovulatorios hemorrágicos y las concentraciones de P4, eCG, E2, VEGF y PGFM se compararon las concentraciones de cada hormona por medio de un análisis de varianza para mediciones repetidas utilizando la semana de gestación y tratamiento como efectos principales.

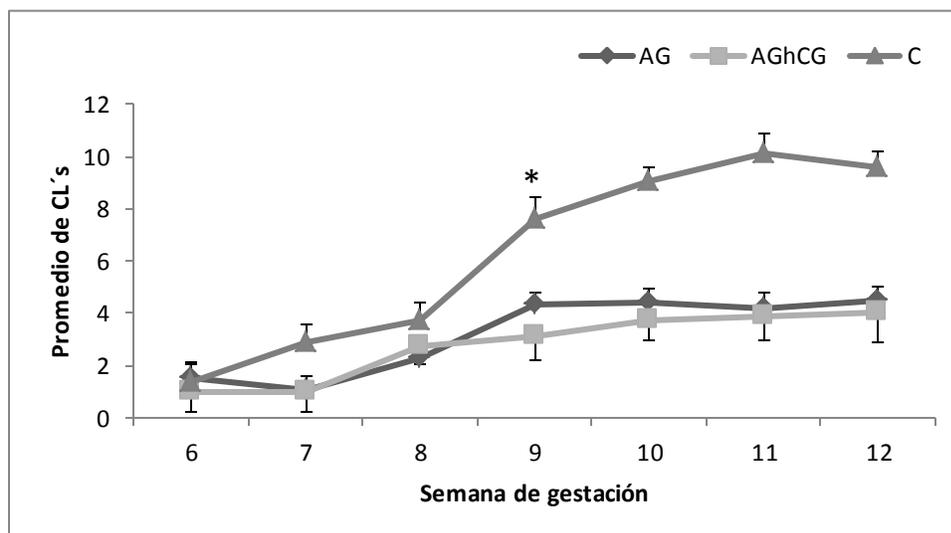
J. DIAGRAMA DEL EXPERIMENTO



## VI. RESULTADOS

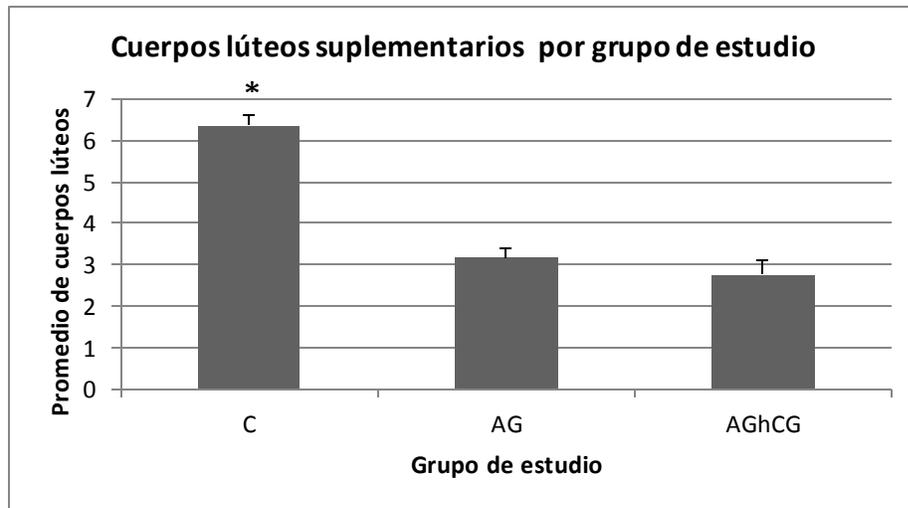
### A. FORMACIÓN DE CUERPOS LÚTEOS SUPLEMENTARIOS

En la figura 1.1 se observa que en los grupos AG y AGhCG la acumulación de cuerpos lúteos fue similar durante todo el periodo de estudio por el contrario, el grupo control tuvo siempre mayor número de cuerpos lúteos sin embargo, fue hasta la semana 9 de gestación en la que la diferencia entre los dos primeros y el grupo control fue significativa ( $p < 0.05$ ). Los grupos C, AG y AGhCG acumularon  $7.62 \pm 0.8$ ,  $4.32 \pm 0.43$  y  $3.08 \pm 0.89$  estructuras respectivamente.



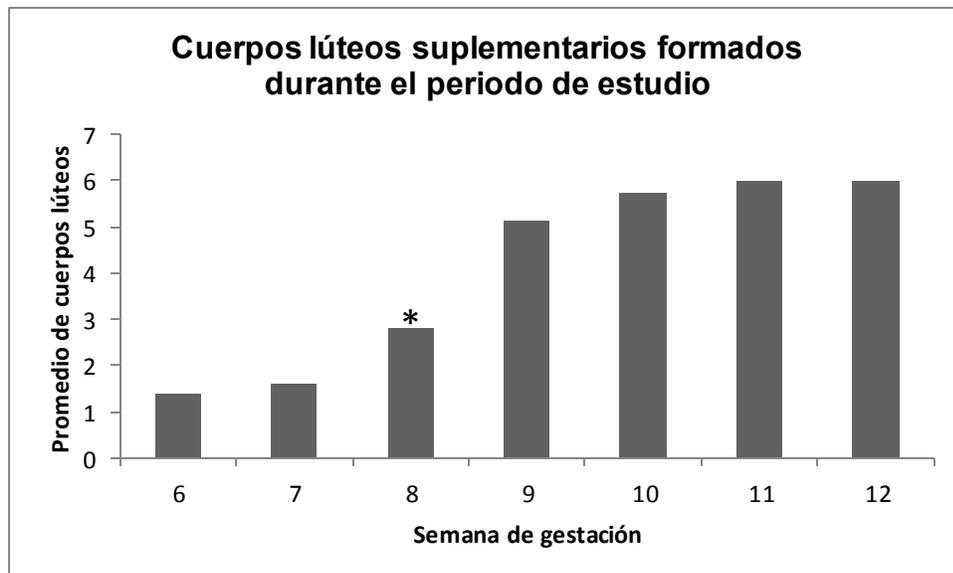
**Figura 1.1** Número de cuerpos lúteos suplementarios (media  $\pm$  ee) que acumuló cada grupo de estudio durante el periodo experimental. En la semana 9 el grupo control fue significativamente mayor que los otros dos ( $p < 0.05$ ).

Los tres grupos de estudio formaron cuerpos lúteos suplementarios ya sea por ovulación secundaria y/o por la formación de folículos anovulatorios hemorrágicos sin embargo, el grupo que fue significativamente mayor en cuanto a formación de dichas estructuras fue el grupo control ( $p < 0.05$ ) con un promedio de  $6.35 \pm 0.25$ , mientras que el grupo de yeguas con el antagonista de GnRH (AG) tuvo  $3.18 \pm 0.19$  y el grupo de yeguas con el antagonista más hCG (AGhCG) formó  $2.77 \pm 0.32$  estructuras lúteas, y entre ellos no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ).



**Figura 1.2** Número de cuerpos lúteos suplementarios (media  $\pm$  ee) que acumuló cada grupo de estudio. El asterisco indica el grupo que fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ).

Desde el inicio del estudio se observó la formación de estructuras lúteas secundarias como accesorias pero fue hasta la semana 8 de gestación en la que el número de cuerpos lúteos aumentó significativamente, de tal manera que en la semana 7 de gestación habían  $1.61 \pm 0.36$  y para la 8 llegó a  $2.81 \pm 0.35$  y continuó aumentando hasta acumular (media  $\pm$  ee) entre  $5.12 \pm 0.37$  y  $5.99 \pm 0.3$  estructuras durante el resto del estudio (figura 1.3).



**Figura 1.3** Número de cuerpos lúteos suplementarios (media  $\pm$  ee) que se acumularon durante el periodo de estudio en los grupos experimentales y el control.

B. FALLA EN LA OVULACIÓN DE YEGUAS GESTANTES TRATADAS CON UN ANTAGONISTA DE GnRH

1. Cuerpos lúteos suplementarios (CLs secundarios + CLs accesorios)

En el cuadro 1 se observa que en más del cincuenta por ciento de las yeguas se inhibió la ovulación secundaria y en su lugar se formaron cuerpos lúteos accesorios sin embargo, dos yeguas ovularon al inicio del tratamiento con el antagonista, de las cuales solo una formó cuerpos lúteos accesorios; tres yeguas mantuvieron la gestación, durante el periodo experimental únicamente con el cuerpo lúteo primario.

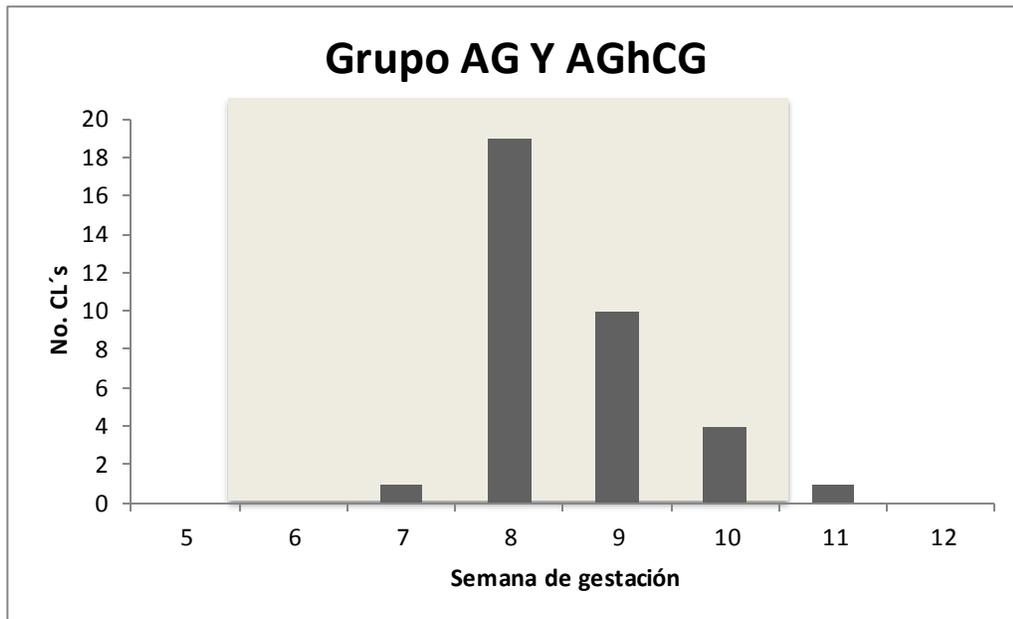
**Cuadro 1. Formación de cuerpos lúteos secundarios y accesorios en yeguas tratadas con un antagonista de GnRH (n=6)**

Estructura	No. de yeguas		Semanas gestación
	AG	AGhCG	
Cuerpos lúteos accesorios	2/3 (66.66%)	3/3 (100%)	7-11
Cuerpos lúteos secundarios y accesorios	1/3 (33.34%)	0/3 (0%)	6-8
*Solo cuerpo lúteo primario	3/5	0/5	-
*Solo cuerpo lúteo secundario	1/5	0/5	6
*Luteinizaciones espontáneas	1/5	0/5	9

\* Yeguas no incluidas en el cuerpo del estudio (Ver Anexo).

2. Cuerpos lúteos accesorios

En la figura 2 se observa que la formación de los cuerpos lúteos accesorios en el grupo AG y AGhCG inició a finales de la séptima semana de gestación y continuó durante todo el periodo experimental de manera que para la semana 12 de gestación ya no se detectó la formación de nuevas estructuras lúteas. Sin embargo, fue durante la semana 8 de gestación en la que se formaron la mayoría de dichas estructuras (50-56 días de gestación).



**Figura 2.** Número de cuerpos lúteos accesorios formados en yeguas que recibieron el tratamiento con un antagonista de GnRH y las que recibieron antagonista de GnRH+hCG. El mayor número de estructuras lúteas accesorias se dio durante la semana 8 de gestación. El área sombreada representa el periodo de tratamiento con el antagonista de GnRH.

C. FALLA EN LA OVULACIÓN DE YEGUAS CON GESTACIÓN EQUINA QUE NO RECIBIERON TRATAMIENTO CON UN ANTAGONISTA DE GnRH (GRUPO CONTROL) .

1. Cuerpos lúteos suplementarios

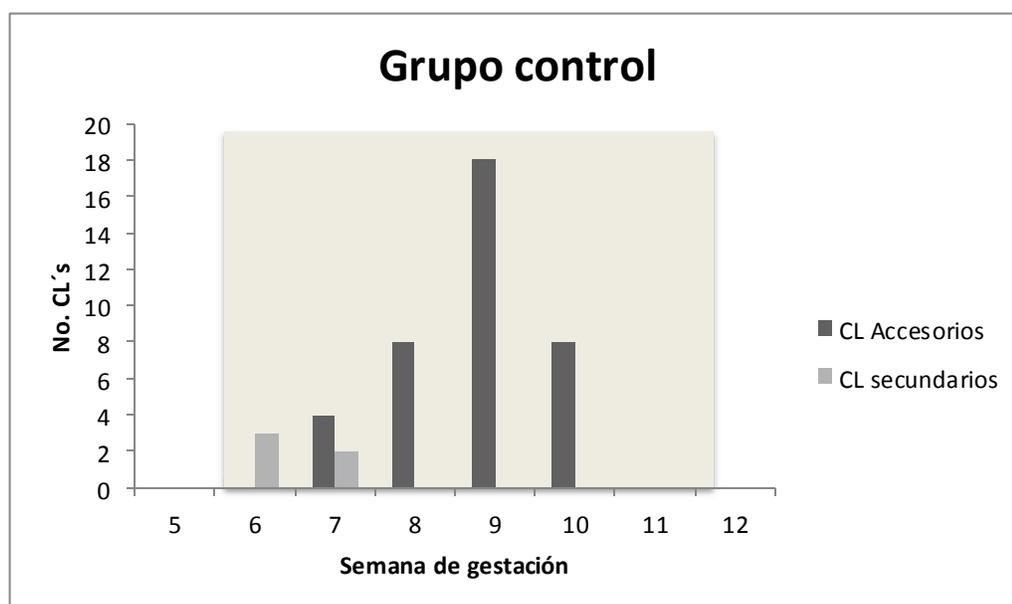
Como se puede observar en el cuadro 2, en todas las yeguas del grupo control se formaron cuerpo lúteos secundarios así como uno o más cuerpos lúteos. Solo una yegua presentó una ovulación secundaria durante la semana 7 de gestación sin formación de cuerpos lúteos accesorios.

**Cuadro 2. Formación de cuerpos lúteos secundarios y accesorios en las yeguas que no recibieron tratamiento con el antagonista de GnRH (n=4)**

Estructura	No. de yeguas	Semana de gestación
Cuerpos lúteos accesorios	0/4 (0%)	-
Cuerpos lúteos secundarios y accesorios	4/4 (100%)	6-10
* Solo cuerpo lúteo secundario	1/1	-

\* Yegua no incluida en el cuerpo de estudio (Ver Anexo).

En el grupo control, a diferencia de los grupos experimentales, se observó la formación de cuerpos lúteos secundarios durante la semana 6 y 7 de gestación. en tanto la formación de cuerpos lúteos accesorios inició entre las semanas 7 y 8 de gestación desde la cual continuaron desarrollándose más estructuras hasta la semana 10, alcanzando el máximo número de estructuras durante la semana 9 de gestación (Figura 3).

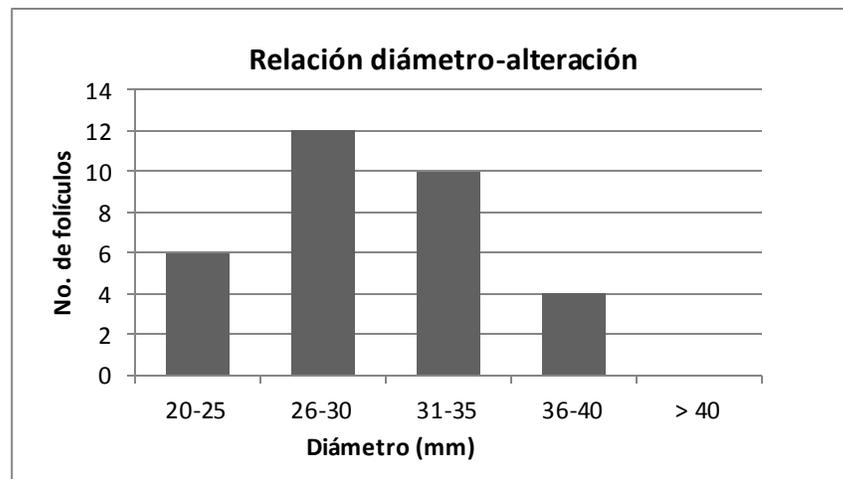


**Figura 3.** Número de cuerpos lúteos suplementarios formados entre los días 35 a 84 de gestación en las yeguas que no recibieron el tratamiento con un antagonista de GnRH. El mayor número de estructuras lúteas accesorias se formó durante la semana 9 de gestación. El área sombreada representa el periodo de tratamiento con el anti-GnRH.

## D. CARACTERIZACIÓN DE CUERPOS LÚTEOS ACCESORIOS/FOLÍCULOS ANOVULATORIOS HEMORRÁGICOS (FAH)

### 1. Alteraciones en el antro folicular

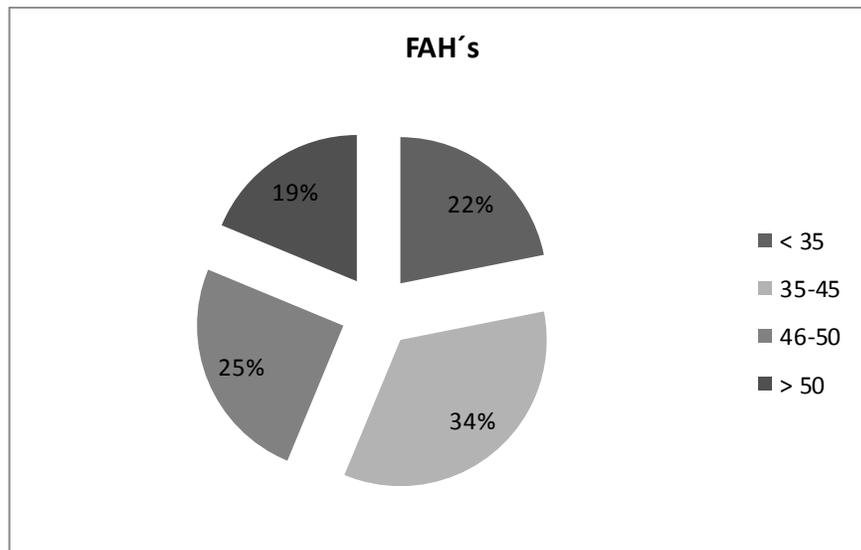
En la figura 4 se muestra que la mayoría de las alteraciones de los folículos observados mediante ultrasonografía se dieron cuando medían entre 26 y 30 mm de diámetro. Sin embargo, podían verse alteraciones en folículos desde 20-25 mm de diámetro. Nótese que no se encontró ningún folículo  $\geq 40$  mm de diámetro sin haber mostrado alteraciones en líquido folicular previamente.



**Figura 4** Diámetro folicular en el que se observaron las primeras alteraciones del antro folicular.

### 2. Diámetro máximo de los FAH's/cuerpos lúteos accesorios

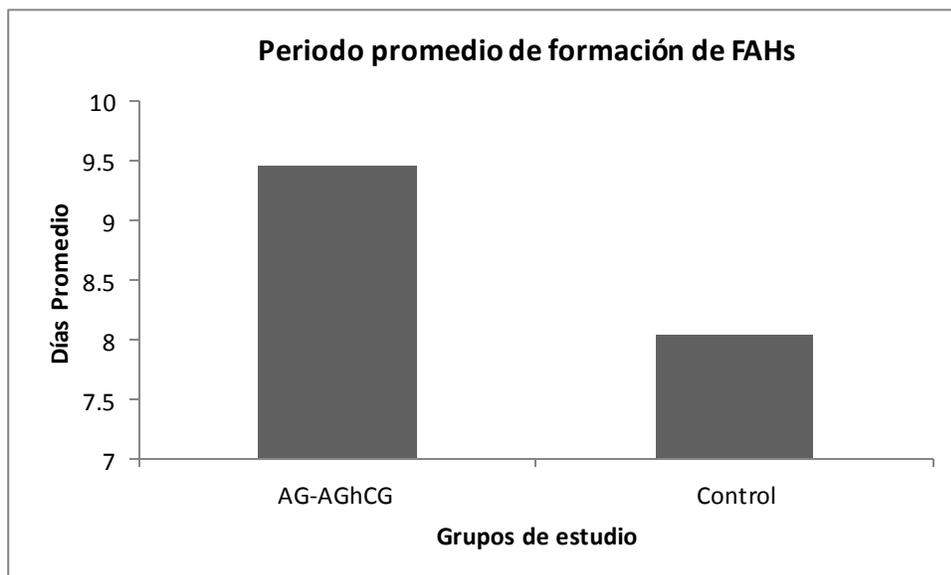
La figura 5 muestra que solo el 19 % de los FAHs observados alcanzaron como diámetro máximo más de 50 mm seguido por el 22% de los folículos que quedaron por debajo de los 35 mm de diámetro y el 25 % de los que midieron entre 46 y 50 mm. Durante las observaciones predominaron, con un 34%, los FAHs que alcanzaron un diámetro máximo comprendido entre 35-45 mm previo a su luteinización.



**Figura 5** Diámetro folicular que alcanzaron los FAH's.

### 3. Periodo de formación

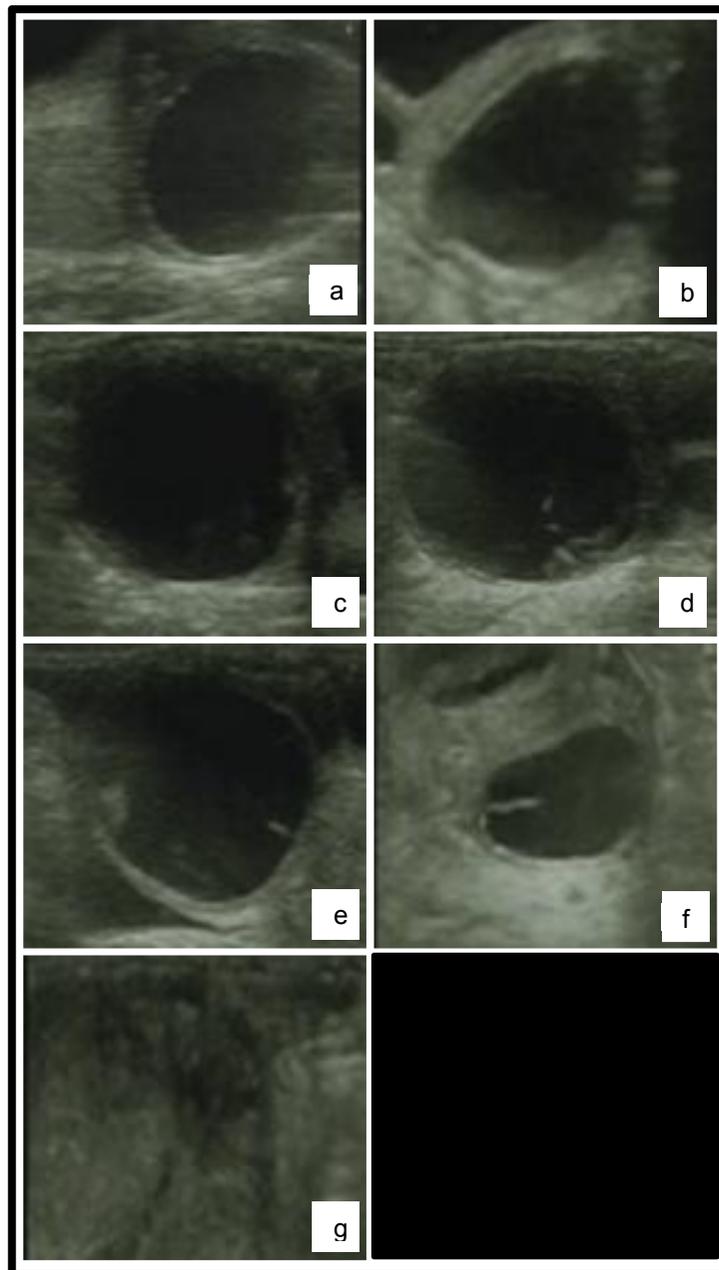
En la figura 6 se observa el tiempo que tardaron en formarse los FAHs desde que se observaron las primeras alteraciones hasta la luteinización. En promedio, los FAHs del grupo control tardaron menos tiempo en luteinizarse que los de los grupos que recibieron el antagonista de GnRH.



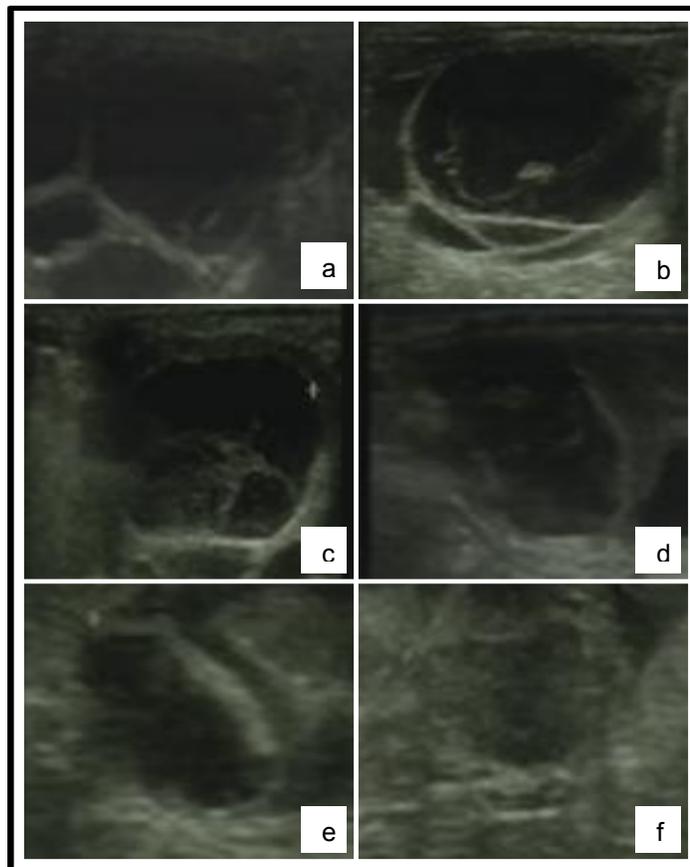
**Figura 6** Periodo promedio de formación de los FAHs en las yeguas control y en las yeguas que recibieron el antagonista de GnRH. Los FAHs del grupo control tuvieron un periodo de formación menor al de los otros grupos.

4. Alteraciones observadas a la ultrasonografía modo B en los FAH's

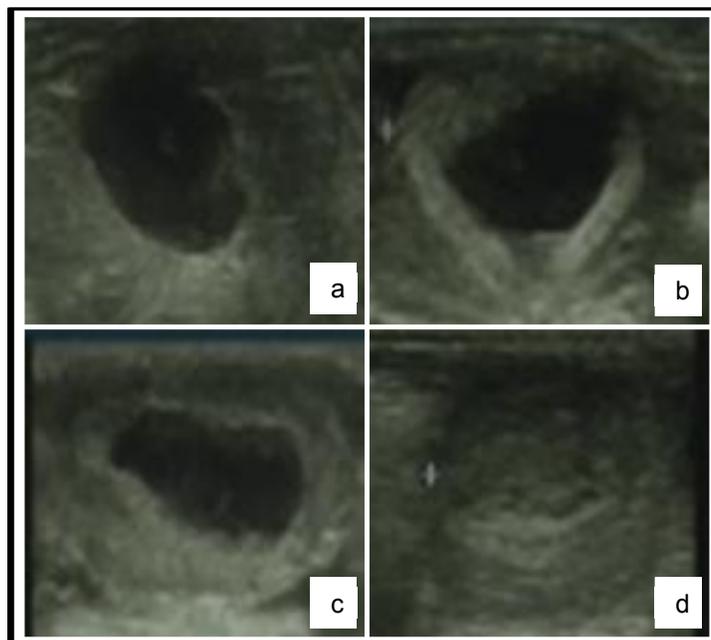
En el presente trabajo se observaron cuatro diferentes secuencias de formación de FAH's además de la secuencia conocida. En las siguientes figuras (7.1 – 7.5) se muestran las características de cada una.



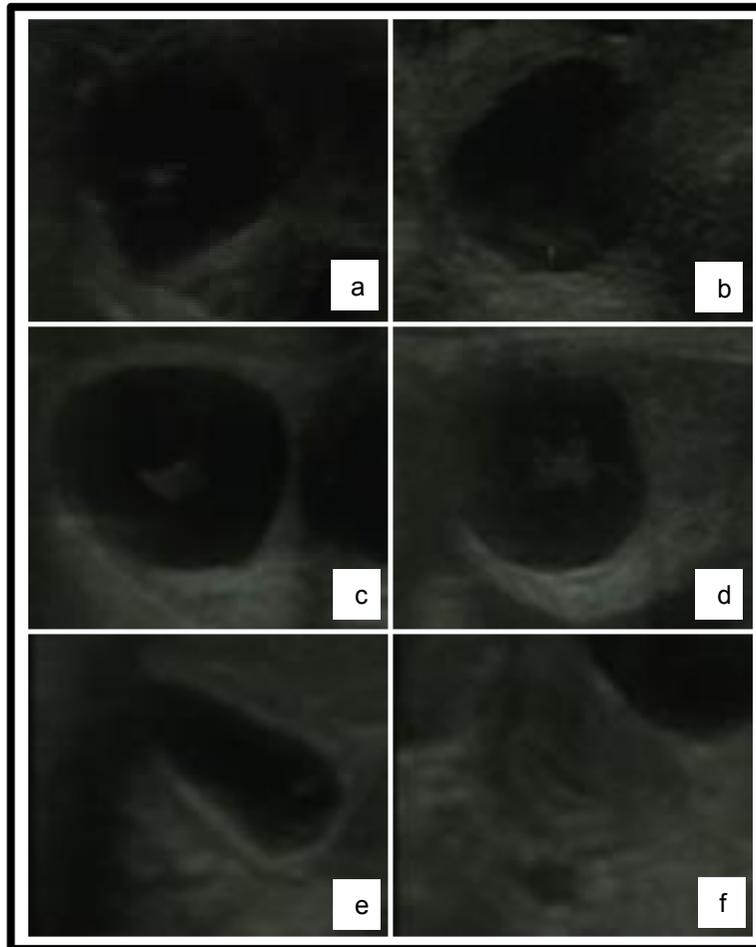
**Figura 7.1** Secuencia de formación de FAH No 1. a) Folículo sin alteraciones, b,c) Puntilleo ecogénico, d) Aparición de cadenas ecogénicas, e) Regresión folicular, f) Luteinización, g) cuerpo lúteo formado. Diámetro mayor alcanzado: 35 mm.



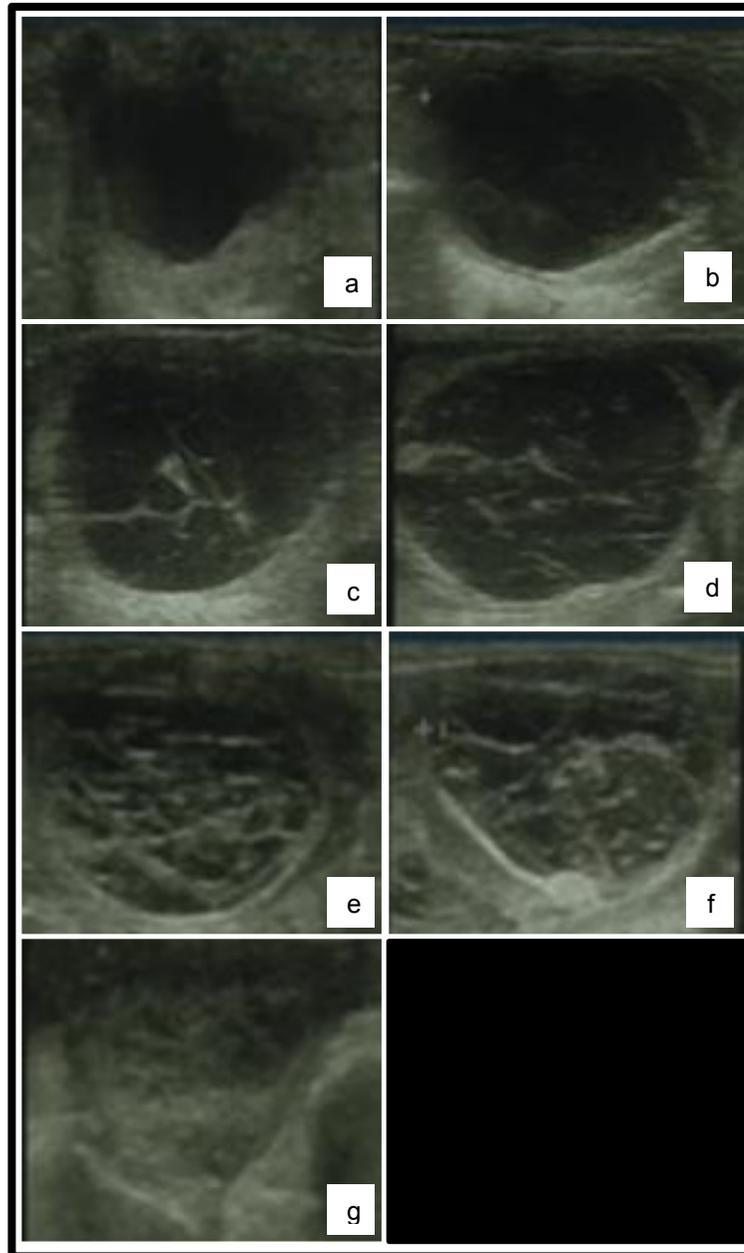
**Figura 7.2** Secuencia de formación de FAH No. 2. a) Puntilleo ecogénico, b) Aparición de cadenas ecogénicas, c,d) Formación de trabéculas, e) Luteinización, f) cuerpo lúteo. Diámetro máximo alcanzado de 40 mm.



**Figura 7.3** Secuencia de formación de FAH No. 3. a) Ligero puntilleo ecogénico, b,c) Inicia luteinización desde la periferia folicular, d) Luteinización completa. Máximo crecimiento observado fue de 35 mm.



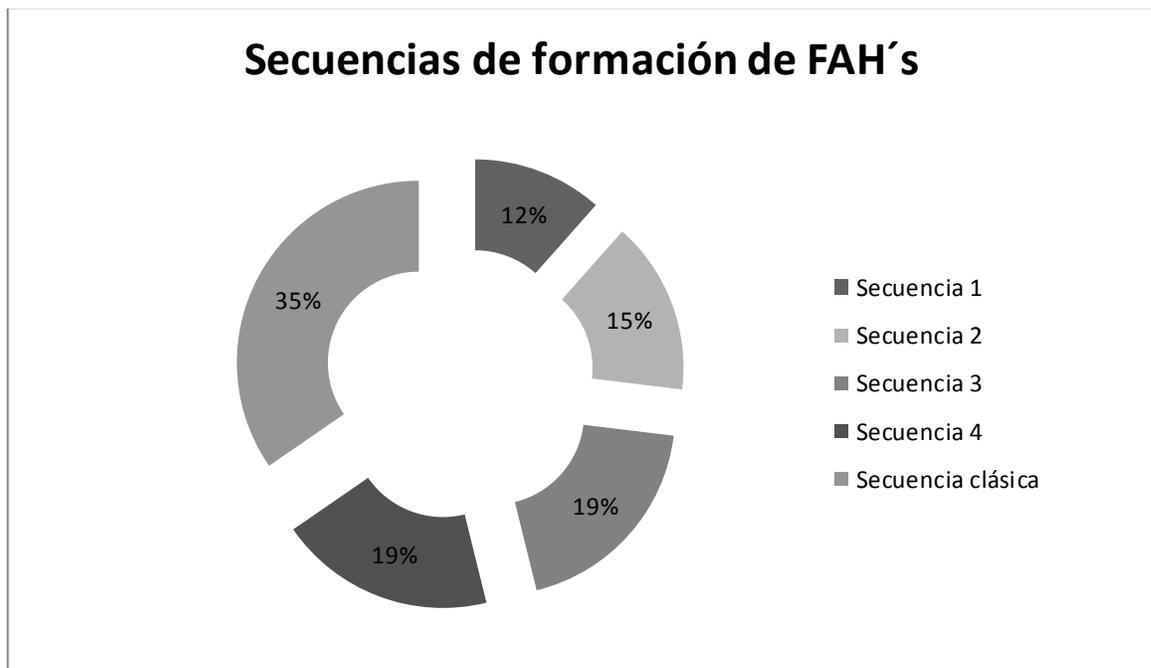
**Figura 7.4** Secuencia de formación de FAH No. 4. a,b,c) Aparición de zona ecogénica, d) Puntilleo ecogénico, e) Luteinización desde la periferia, f) cuerpo lúteo. Observado en folículos de 20-25 mm diámetro. Diámetro mayor alcanzado 35 mm.



**Figura 7.5** Secuencia de formación de FAH Clásica. a) folículo sin alteraciones, b) Puntilleo ecogénico, c) Aparición de cadenas ecogénicas, d) Formación de trabéculas, e,f) Crecimiento mayor a 50 mm de diámetro, g) Luteinización.

## 5. Secuencias de formación de los folículos anovulatorios hemorrágicos (FAH)

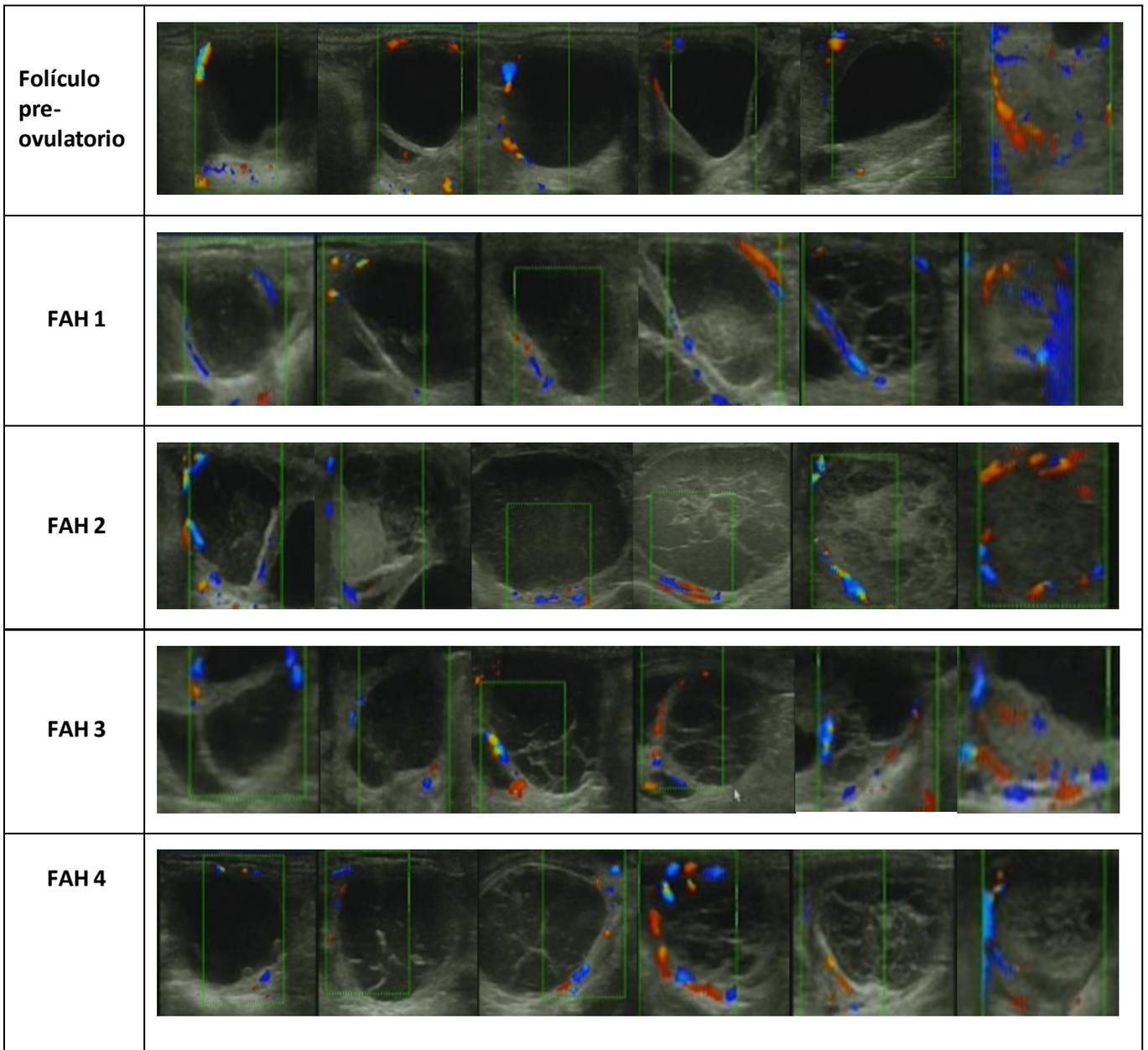
Como se muestra en la figura 8, fueron cinco las secuencias de formación de FAH's encontradas, predominando la formación de FAH's del tipo clásico con una incidencia del 35 %. Cabe resaltar que las secuencias observadas en el presente estudio bajo los efectos del antagonista de GnRH no habían sido previamente reportadas.



**Figura 8.** Porcentaje de formación de FAH's de cada una de las secuencias descritas. La secuencia que predominó durante el presente estudio fue la secuencia clásica.

## 6. Flujo sanguíneo de los folículos anovulatorios hemorrágicos (FAH)

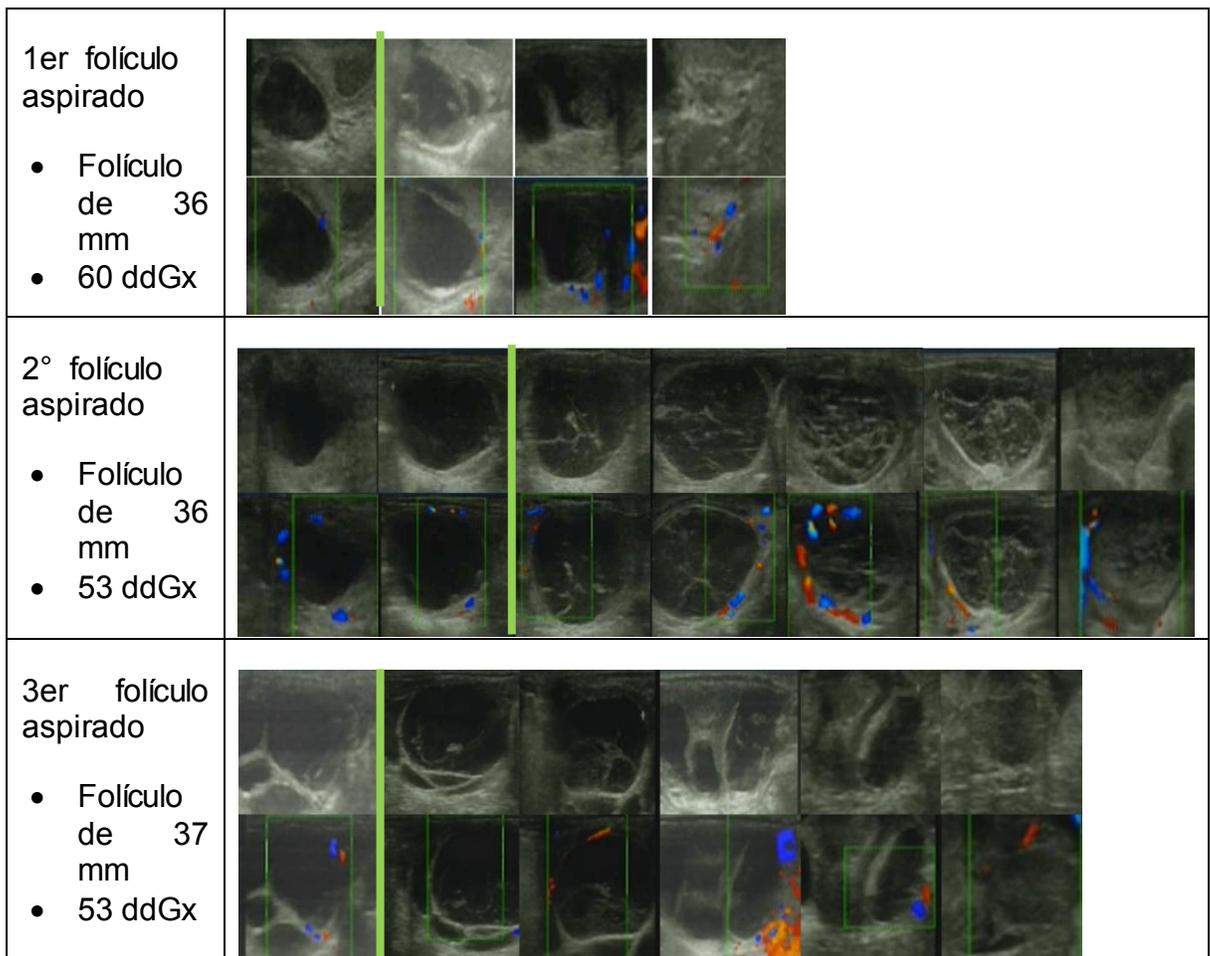
En la figura 9 se muestra la irrigación de un folículo preovulatorio y la de cuatro FAH's que se monitorearon cada 24 hrs con un ultrasonido doppler a color. El aumento en la irrigación en el folículo ovulatorio se da durante la formación del cuerpo lúteo y el en caso de los FAH's el aumento en la irrigación se observó hasta que empezó a trabecularse o luteinizarse.



**Figura 9.** Comparación del flujo sanguíneo en la pared folicular de un folículo preovulatorio y cuatro que presentaron falla en la ovulación.

## E. EFECTO DEL ANTAGONISTA DE GnRH y hCG EN LA FORMACIÓN DE FOLÍCULOS ANOVULATORIOS HEMORRÁGICOS

En la figura 10 se muestran los folículos anovulatorio hemorrágicos provocados por la administración de un antagonista de GnRH y hCG, monitoreados mediante ultrasonografía modo B y Doppler a color. La línea verde indica el momento en el cual se realizó la aspiración del folículo.

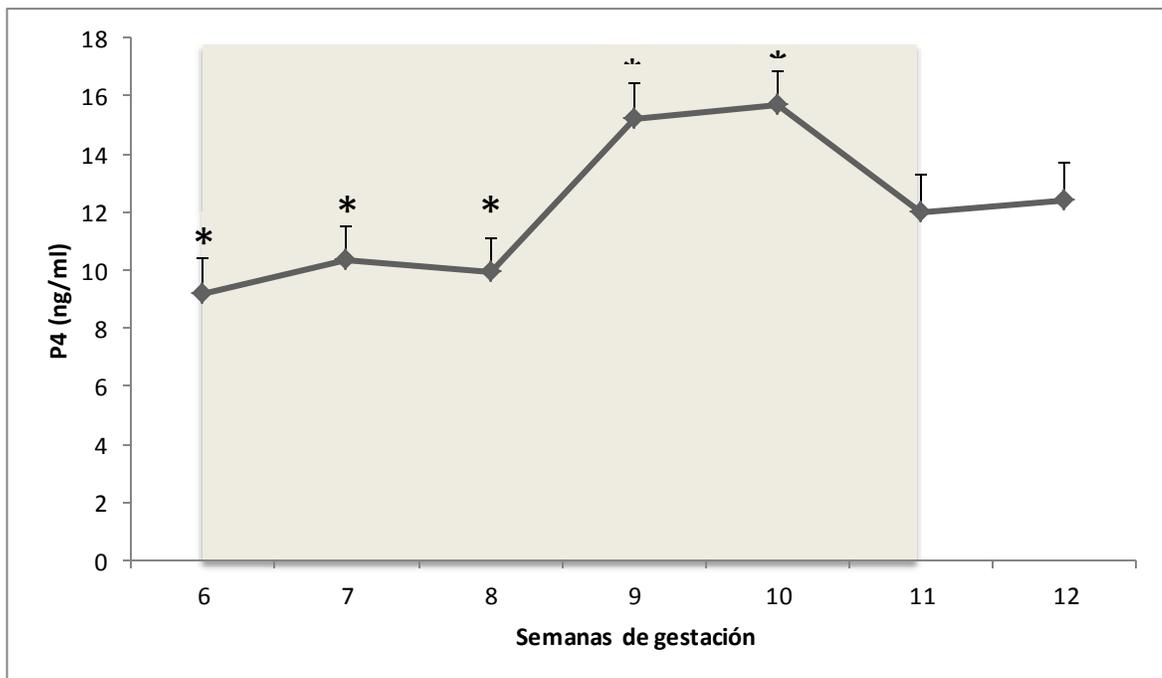


**Figura 10.** Desarrollo de folículos anovulatorios hemorrágicos después del tratamiento con un antagonista de GnRH y la posterior administración de hCG en folículos mayores de 35 mm de diámetro observados mediante ultrasonografía modo B y Doppler a color.

## F. CONCENTRACIÓN HORMONAL DE P4, eCG Y E2 EN YEGUAS GESTANTES (35-84 DÍAS DE GESTACIÓN)

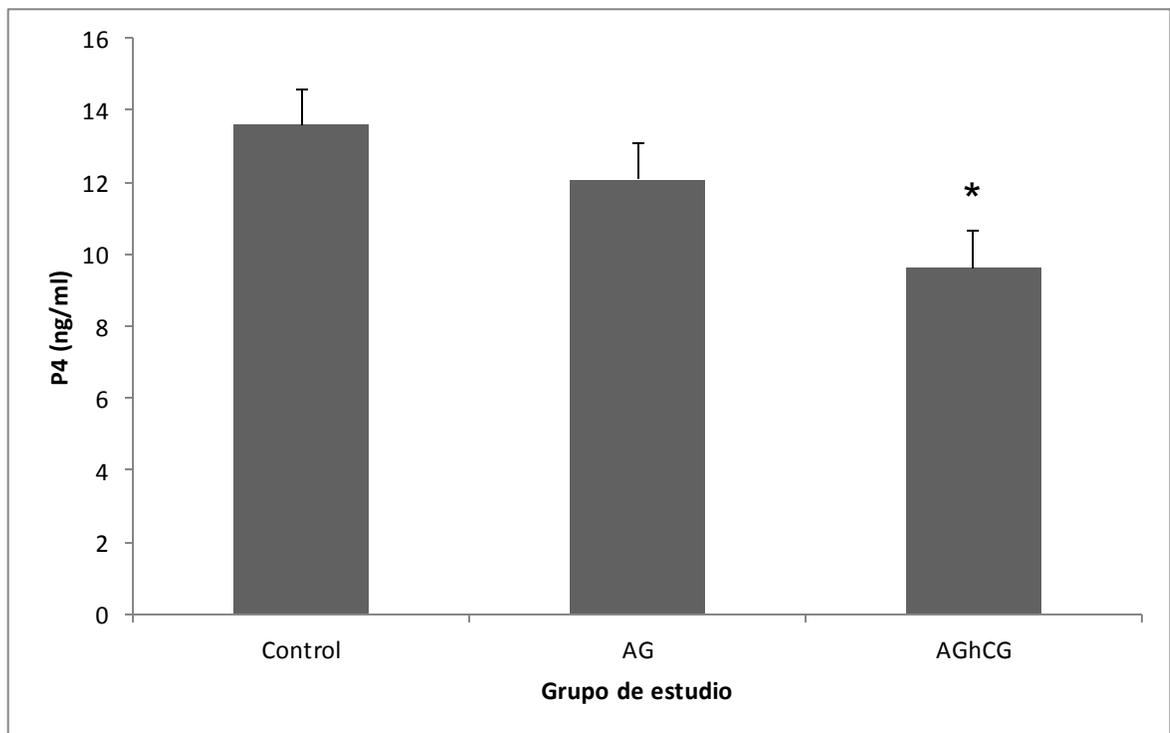
Con el objeto de evaluar el efecto de la administración de un antagonista de GnRH sobre la formación de folículos anovulatorios hemorrágicos y las concentraciones de P4, eCG y E2, entre la semana 6 y 12 de gestación, se empleó un análisis de varianza para mediciones repetidas utilizando la semana de gestación y tratamiento como efectos principales.

En la figura 11.1 se observa que las concentraciones promedio de progesterona (media  $\pm$  ee), para los tres grupos (AG, AG+hCG y C), fueron significativamente mayores durante las semanas 9 y 10 de gestación ( $p < 0.05$ ) que las semanas 6, 7 y 8, alcanzando concentraciones de 15 ng/ml para posteriormente descender y mantenerse entre los 11 y 12 ng/ml de progesterona.



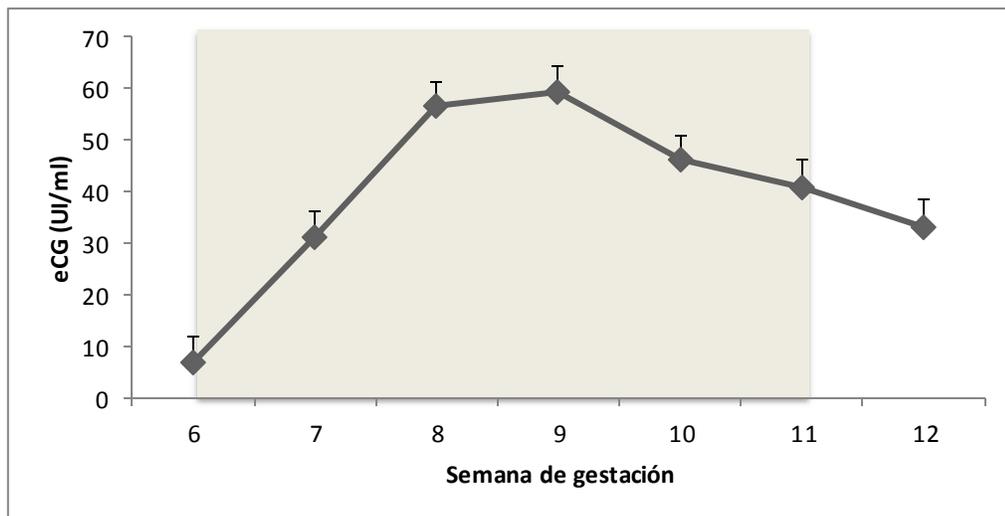
**Figura 11.1** Concentración de progesterona (media  $\pm$  ee) en yeguas con gestación equina entre los 35 y 84 días de gestación. El área sombreada indica el periodo de tratamiento con el antagonista de GnRH que recibieron las yeguas dentro de los grupos experimentales. \* indica las semanas en las que hubo diferencia.

En la figura 11.2 se observa que las concentraciones de progesterona (media  $\pm$  ee) en las yeguas que fueron tratadas con un antagonista de GnRH y que en presencia de un folículo mayor a 35 mm de diámetro recibieron tratamiento con hCG (AGhCG), fueron significativamente menores a las de los otros dos grupos ( $p < 0.05$ ). En el caso de las yeguas que recibieron únicamente el tratamiento con el antagonista de GnRH (AG) las concentraciones de progesterona alcanzaron los 12 ng/ml y el grupo control obtuvo 13 ng/ml a diferencia del grupo AGhCG que apenas alcanzó los 9 ng/ml.



**Figura 11.2** Concentración de progesterona por grupo de estudio (media  $\pm$  ee). \* indica el grupo en el que hubo diferencia. **AG**: grupo anti GnRH; **AGhCG**: grupo anti GnRH+hCG; **C**: grupo control.

En cuanto a las concentraciones de eCG (media  $\pm$  ee) no se encontró diferencias significativas durante el desarrollo del estudio en los tres grupos ( $p > 0.05$ ), en la figura 12.1 se observa que las concentraciones de eCG comienzan a aumentar en la semana 6 de gestación iniciando con una concentración cercana a las 6 UI/ml que continuó incrementando hasta alcanzar 59 UI/ml en la semana 9 de gestación. A partir de ese momento inicia su descenso pero se mantiene por encima de las 30 UI/ml hasta el último muestreo.

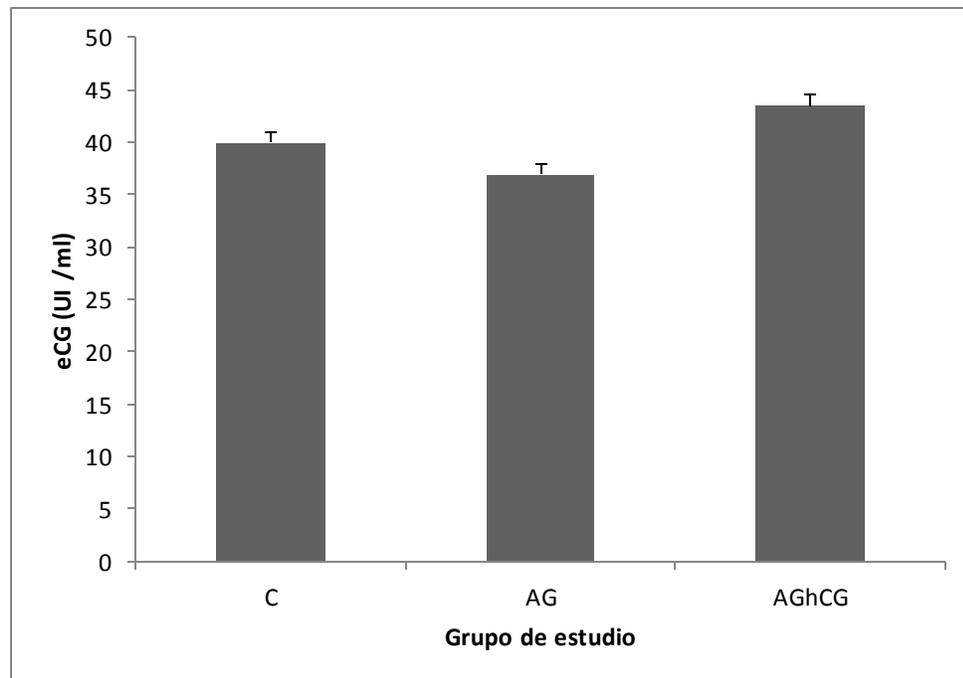


**Figura 12.1** Concentración promedio de eCG (media  $\pm$  ee) de los tres grupos de estudio en yeguas con gestación equina entre los 35 y 84 días de gestación. El área sombreada indica el periodo de tratamiento con el antagonista de GnRH que recibieron las yeguas dentro de los grupos experimentales.

El aumento abrupto en la formación de FAHs y cuerpos lúteos accesorios, en los tres grupos del presente trabajo (Figura 1.1, 2 , 3), observado en la semana 8 de gestación y que posteriormente disminuyó en la semana 10 correspondió con el patrón de secreción de la eCG de manera que, en la semana 6 al inicio del muestreo sus concentraciones comenzaron a elevarse y en las yeguas control, debido a la sinergia con la LH hipofisaria, se dieron las ovulaciones secundarias, posteriormente se elevaron rápidamente hasta alcanzar un pico de 56 UI/ml en la semana 8 momento en el que en las yeguas tratadas con antagonista de GnRH comenzaron a formar los FAHs y las yeguas control los cuerpos lúteos accesorios.

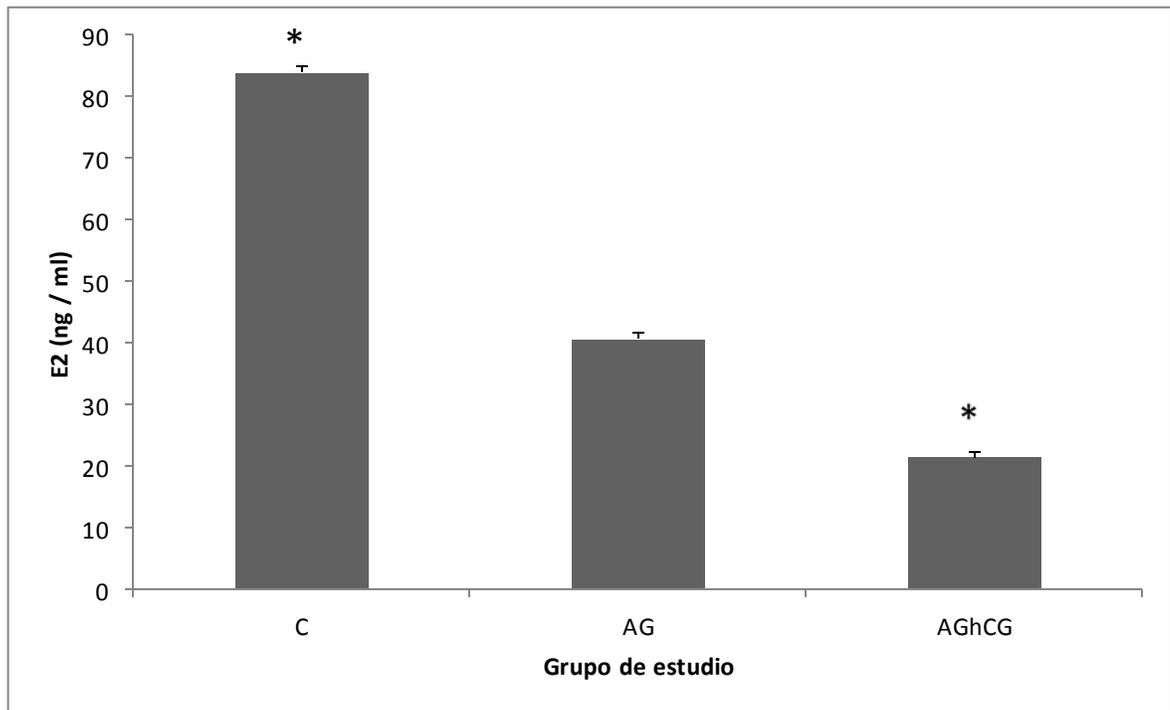
Para la semana 10 se observa como al ir disminuyendo paulatinamente la eCG, el número de FAHs y CLs en formación disminuye también.

En la figura 12.2 se observa que, en cuanto al efecto tratamiento, no hubo diferencia significativa y que las concentraciones de eCG fueron muy similares entre grupos ( $p>0.05$ ).



**Figura 12.2** Concentración de eCG por grupo experimental. No hubo diferencia significativa entre grupos ( $p>0.05$ ). **AG**: grupo anti GnRH; **AGhCG**: grupo anti GnRH+hCG; **C**: grupo control.

Se encontró que en las yeguas control las concentraciones de estradiol (media  $\pm$  ee) fueron significativamente mayores que en los otros dos grupos ( $p<0.01$ ) alcanzando los 84 ng/ml, a su vez el grupo de yeguas tratadas con un antagonista de GnRH y que en presencia de un folículo mayor a 35 mm de diámetro recibieron tratamiento con hCG (AGhCG) fue significativamente menor que el grupo anti GnRH (AG) con concentraciones máximas de estradiol de 21 ng/ml y 40 ng/ml respectivamente ( $p<0.01$ ) (figura 13.2).



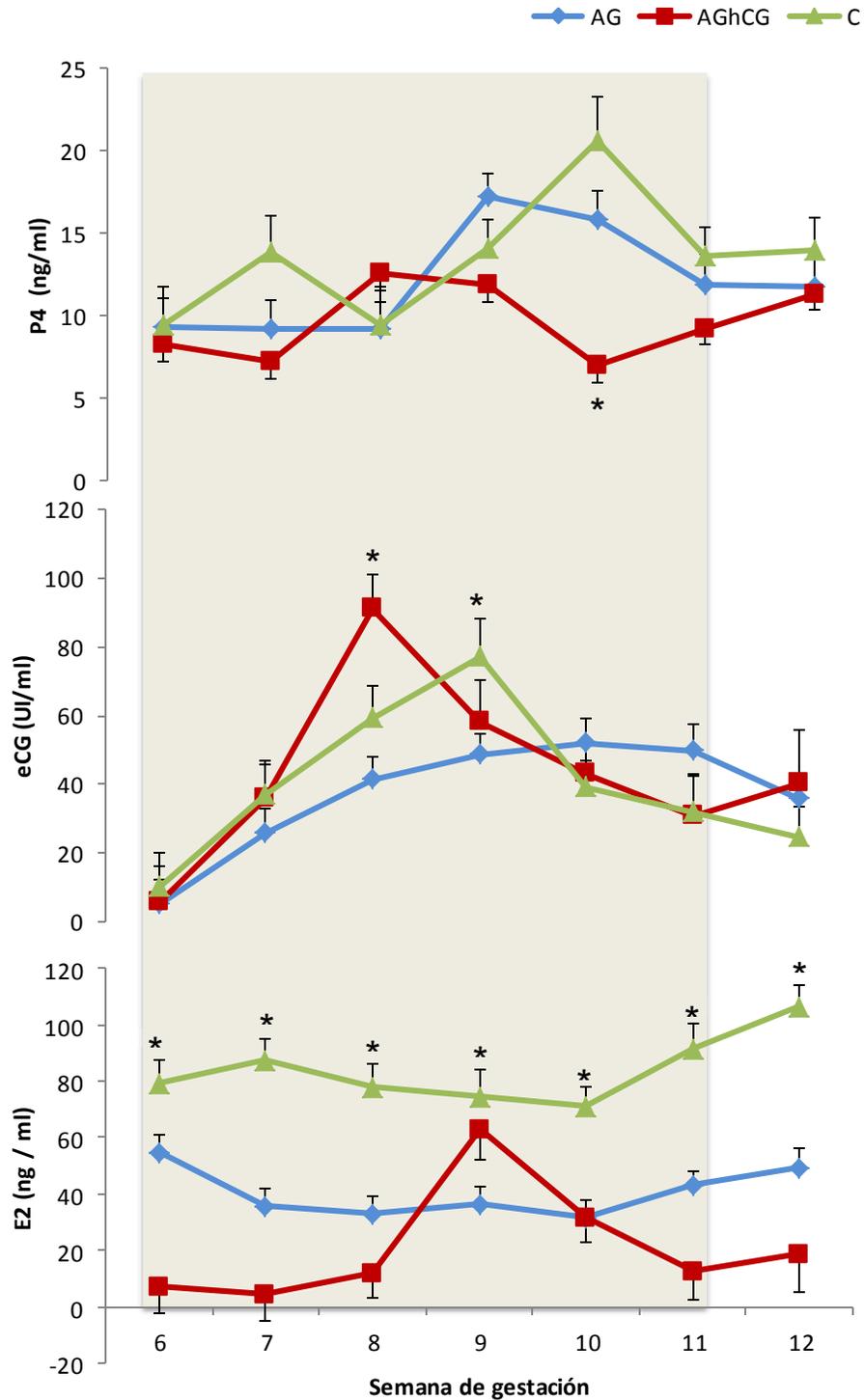
**Figura 13.2** Concentración de estradiol por grupo de estudio (media  $\pm$  ee). \* indican los grupos en los que hubo diferencia. **AG:** grupo anti GnRH; **AGhCG:** grupo anti GnRH+hCG; **C:** grupo control.

Durante la semana 10 de gestación se encontró que las concentraciones de progesterona (media  $\pm$  ee) del grupo de yeguas que fueron tratadas con un antagonista de GnRH y que en presencia de un folículo mayor a 35 mm de diámetro recibieron tratamiento con hCG (AGhCG) fueron menores a las de los otros grupos ( $p < 0.01$ ). En la figura 13.3 se observa que en la semana 10 los grupos anti-GnRH (AG) y control (C) rebasan los 15 ng/ml mientras que el grupo AGhCG alcanza únicamente los 6 ng/ml.

Por otra parte, la figura muestra que respecto al efecto semana-tratamiento hubo una diferencia significativa durante la semana 8 de gestación en donde las concentraciones de eCG (media  $\pm$  ee) de las yeguas tratadas con un antagonista de GnRH y que en presencia de un folículo mayor a 35 mm de diámetro recibieron tratamiento con hCG (AGhCG) fueron significativamente mayores a las de los otros grupos ( $p < 0.05$ ). Las concentraciones de este grupo comenzaron a elevarse

desde que se inició el muestreo en la semana 6 de gestación, elevándose hasta llegar a un pico de 90 UI/ml en la semana 8 de la gestación. Además, en la semana 9 las concentraciones del grupo control fueron mayores a las del grupo anti-GnRH (AG) ( $p < 0.05$ ). Igualmente que el grupo AGhCG, las concentraciones de eCG empezaron a elevarse desde el inicio del muestreo sin embargo, el pico lo alcanzó en la semana 9 con 77 UI/ml.

En cuanto a las concentraciones de estradiol (media  $\pm$  ee) en el grupo control se mantuvieron, desde la semana 6 a la 12 de gestación, por encima de las de los grupos AG y AGhCG ( $p < 0.01$ ), mostrando concentraciones entre 71 y 106 ng/ml. A su vez, se puede ver cómo las concentraciones de estradiol del grupo AG fueron significativamente mayores que el grupo AGhCG ( $p < 0.05$ ) con concentraciones que iban de los 31 ng/ml a los 55 ng/ml excepto en la semanas 9 y 10 de la gestación. Aunque se encontró que las concentraciones del grupo AGhCG fueron significativamente mayores que las del grupo AG en la semana 9, donde alcanzó un pico de producción de 63 ng/ml que superaron a los 36 ng/ml del otro grupo experimental.



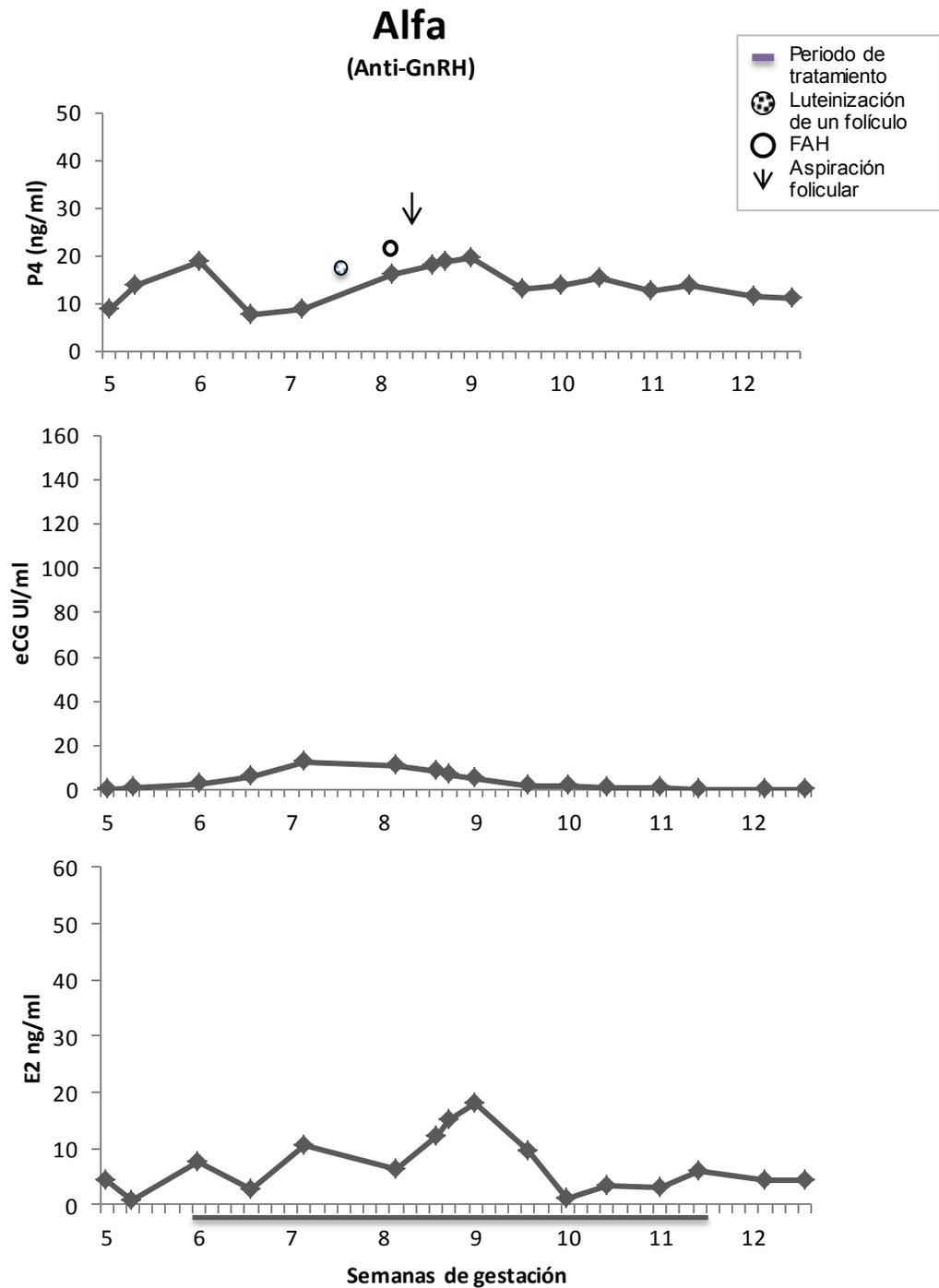
**Figura 13.3** Concentración de P4, eCG y E2 (media  $\pm$  ee) por grupo de estudio entre los días 35 a 84 de gestación. El área sombreada indica el periodo de tratamiento con el antagonista de GnRH que recibieron las yeguas dentro de los grupos experimentales. \* indica la semana en la que hubo diferencia significativa. **AG**: grupo anti GnRH; **AGhCG**: grupo anti GnRH+hCG; **C**: grupo control.

### 1. Concentración hormonal en yeguas tratadas con un antagonista de GnRH

En este grupo de yeguas, se suprimieron las ovulaciones secundarias y predominó la formación de cuerpos lúteos accesorios, como se observa en las figuras 14.1 a 14.3 los FAH's comenzaron a formarse en la semana 8 de gestación. Las concentraciones de progesterona alcanzaron los 42 ng/ml, las concentraciones de eCG se ubicaron cerca de 200 U/ml y finalmente las de estradiol se mantuvieron entre 1 ng/ml y 65 ng/ml.

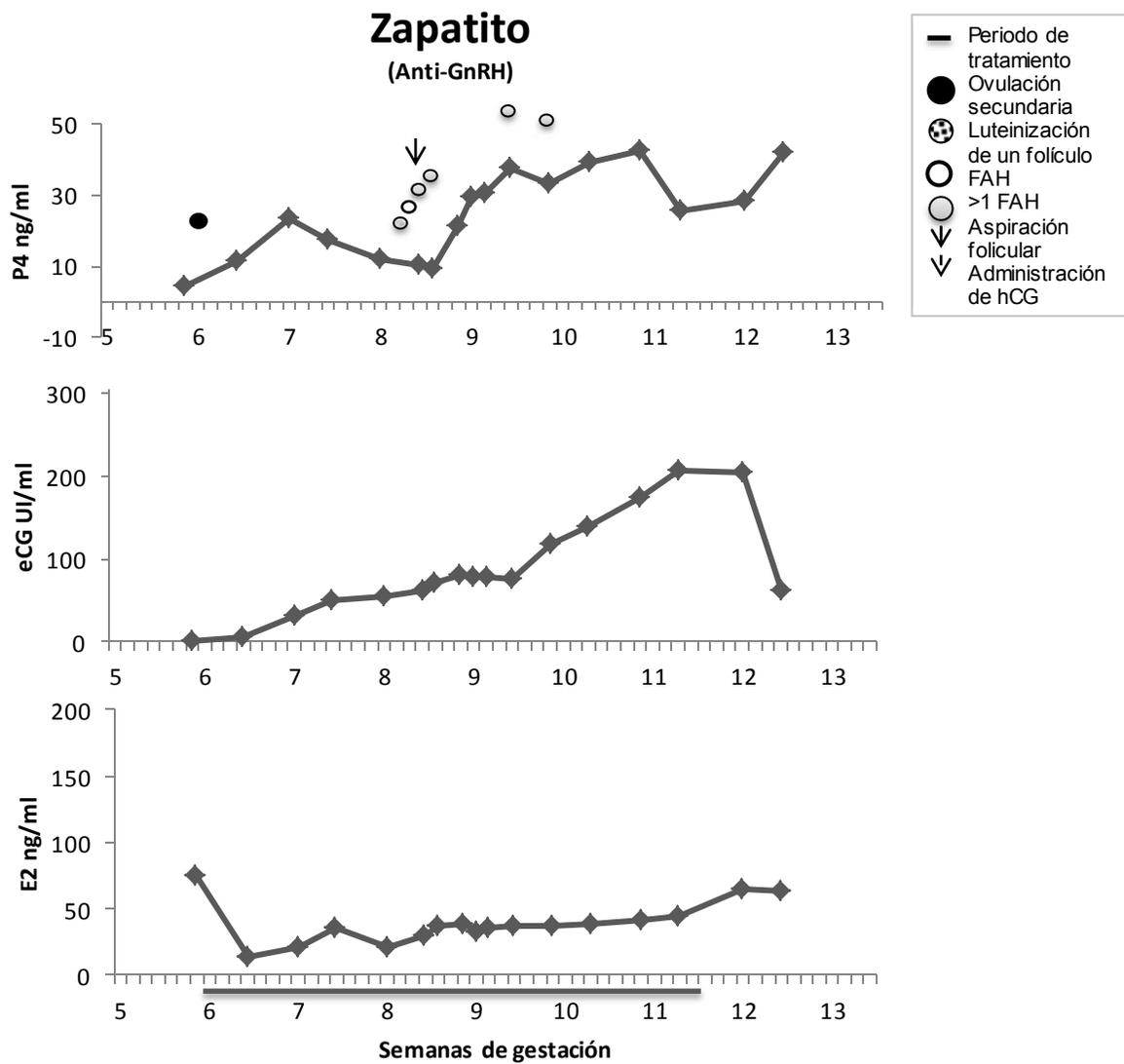
En la figura 14.1, la cual corresponde a la yegua "Alfa", se encontró que, como en el resto del grupo, las ovulaciones secundarias se suprimieron y en su lugar se formaron FAH's sin embargo, el número de estructuras formadas así como las concentraciones de progesterona, E2 y eCG fueron menores a las de las otras yeguas del grupo manteniéndose por debajo de los 20 ng/ml para las dos primeras hormonas y 20 U/ml para eCG. Aunado a ello se puede observar que en la semana 8 el primer FAH que se formó correspondió a un folículo luteinizado es decir, no tuvo el desarrollo normal de un folículo destinado a ovular de manera que únicamente alcanzó 30 mm de diámetro previo a su luteinización. El segundo y último FAH de la yegua "Alfa" se formó a principios de la semana 9 de gestación, éste sí presentó alteraciones en antro folicular por lo que se procedió a la aspiración folicular.

En la yegua "Zapatito" y en la "yegua 10" se observa que el estradiol presenta un aumento hacia la semana 11 de gestación y continúa elevándose hasta el final del estudio.



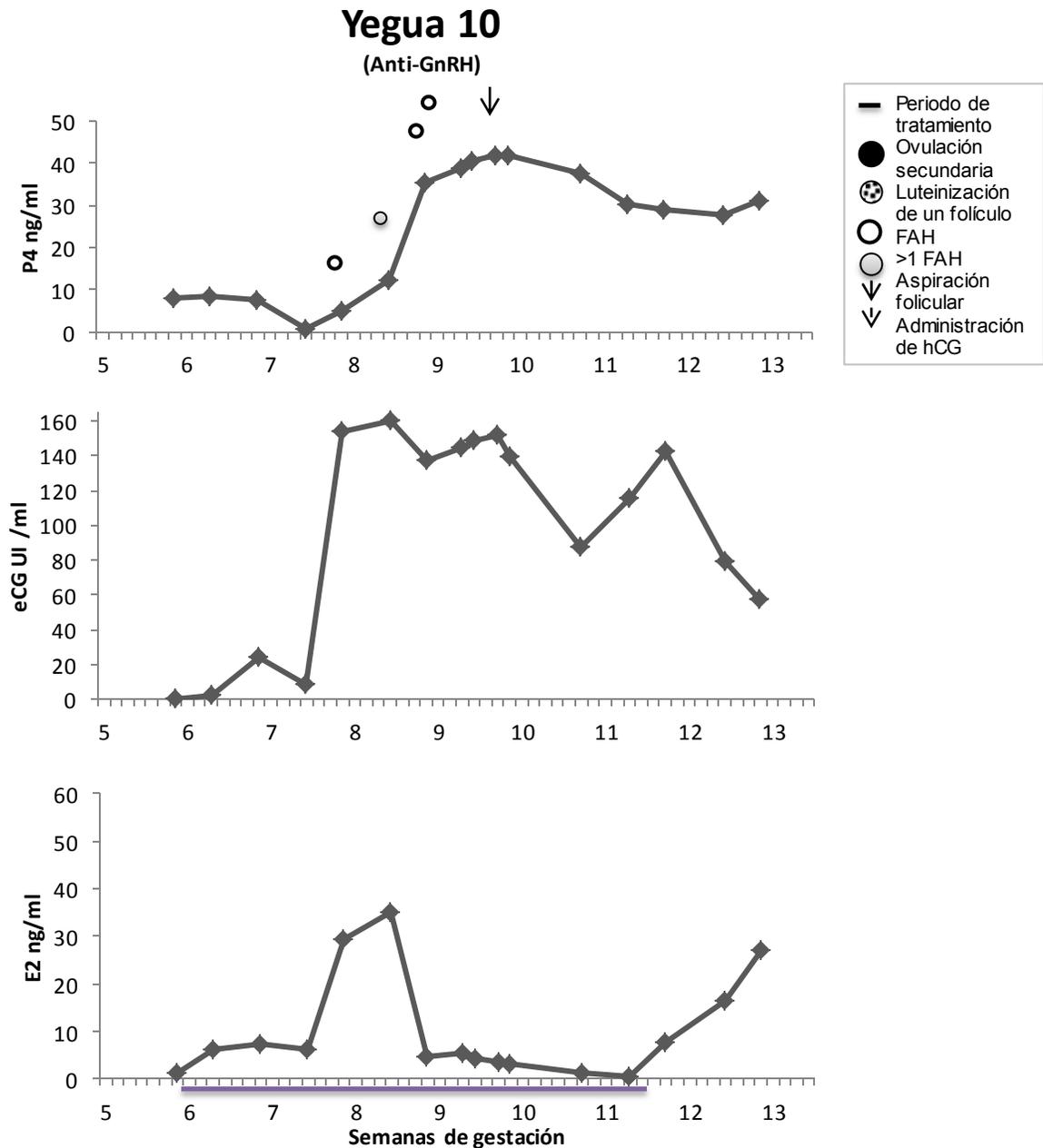
**Figura 14.1** Concentraciones de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina que recibió tratamiento con un antagonista de GnRH y en la cual se aspiró el primer folículo anovulatorio hemorrágico.

En el caso de la yegua “Zapatito” (Figura 14.2) se presentó una ovulación secundaria al inicio del tratamiento es decir, empezando la semana 6 de gestación. Las estructuras lúteas accesorias iniciaron su formación a partir de la semana 8 de gestación, en dicho momento la eCG se encontraba por encima de 50 UI/ml y continuaba en aumento. A diferencia de la yegua “Alfa”, la yegua “Zapatito” formó FAH’s en grupos de manera que se pudo observar la formación simultánea de varias de estas estructuras. Aunque las concentraciones de eCG en esta yegua alcanzaron 200 UI/ml en la semana 12 de gestación, el desarrollo de FAH’s se dio únicamente hasta la semana 10 de gestación.



**Figura 14.2** Concentración hormonal en una yegua con gestación equina, en la cual se aspiró el segundo folículo anovulatorio hemorrágico.

En la “yegua 10” (figura 14.3) la eCG, después de encontrarse por debajo de 50 UI/ml en las semanas 6 y 7 de gestación, tuvo un aumento abrupto en la semana 8 y se mantuvo alrededor de las 150 UI/ml hasta el final del estudio. A pesar de ello, el número de estructuras lúteas que formó fue menor al de la yegua “Zapatito” y se restringió a las semanas 8 y 9 de gestación sin embargo, las concentraciones de



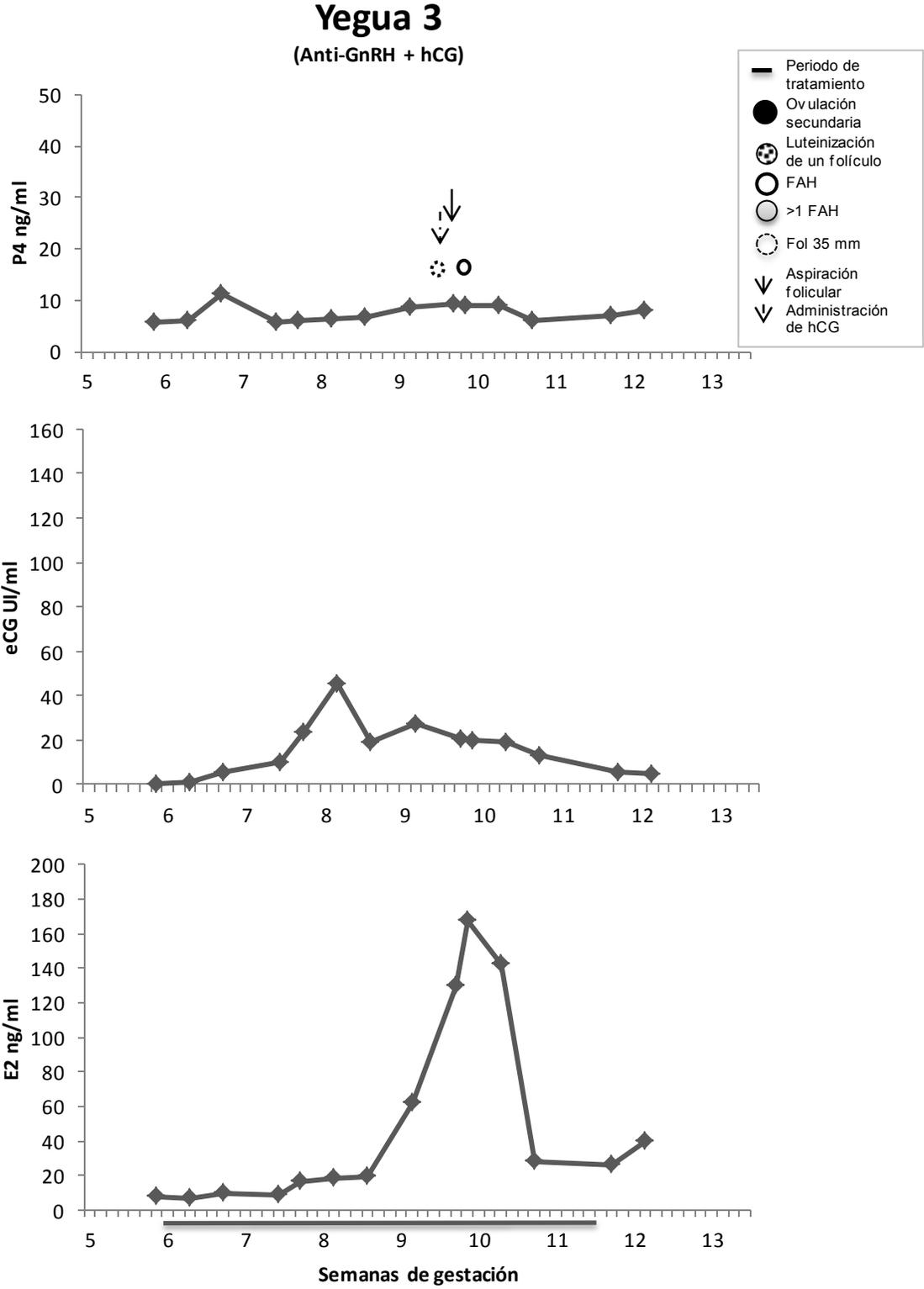
**Figura 14.3** Concentraciones de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina que recibió tratamiento con un antagonista de GnRH y en la cual se aspiró el tercer folículo anovulatorio hemorrágico.

## 2. Concentración hormonal en yeguas tratadas con un antagonista de GnRH y hCG

En este grupo de yeguas, además de la administración del antagonista de GnRH, se administró hCG a dosis de 1500 UI IV a cada yegua en presencia de un folículo mayor o igual a 35 mm de diámetro.

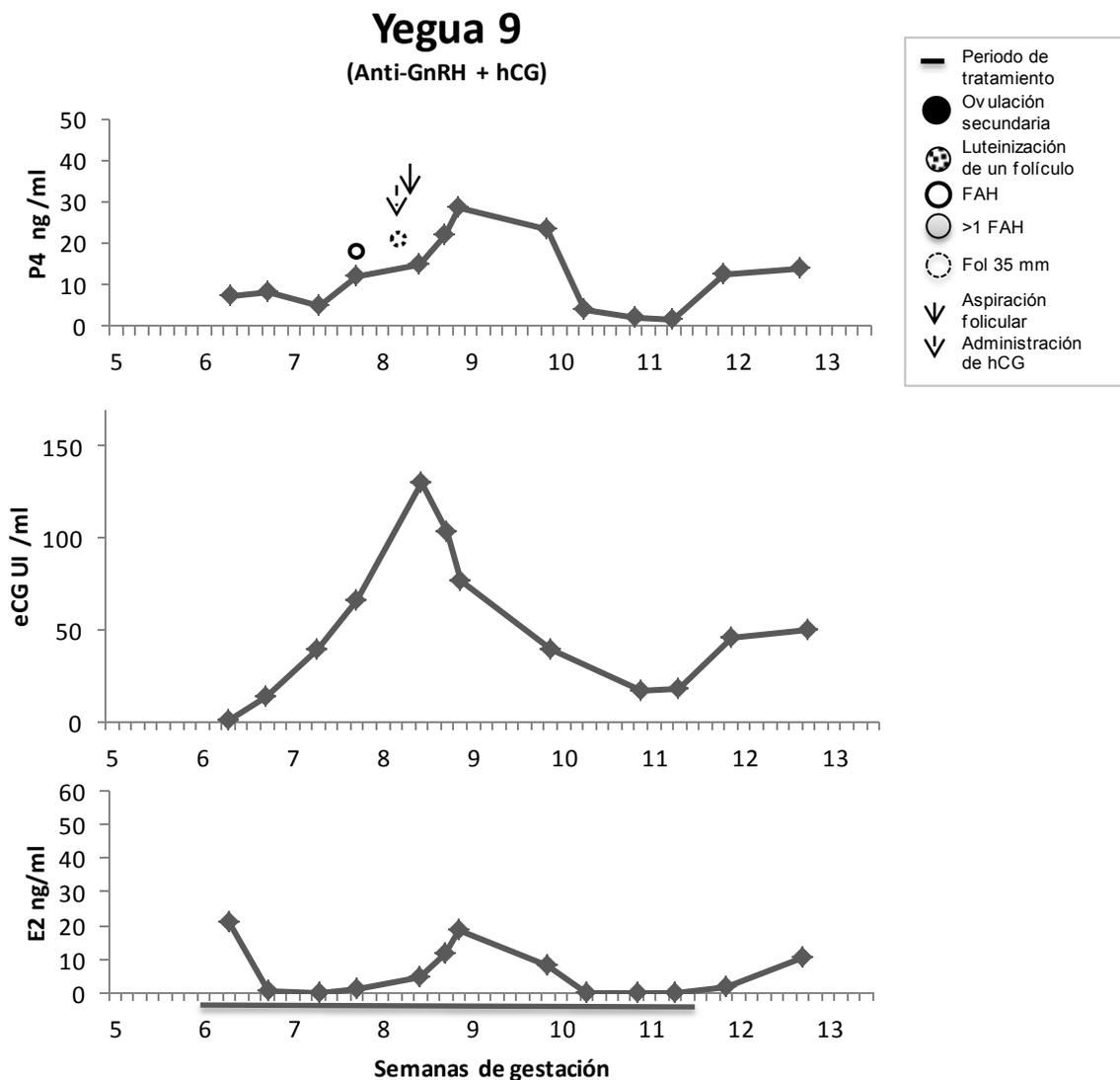
Como era de esperarse, al recibir el tratamiento con el antagonista de GnRH, se suprimieron las ovulaciones secundarias y en su lugar se formaron folículos anovulatorios hemorrágicos, los cuales comenzaron a formarse en la semana 8 de gestación. A diferencia del grupo Anti-GnRH, el número de FAH's que se formó en este grupo fue menor así como las concentraciones de progesterona, manteniéndose por debajo de 20 ng/ml y en solo una de las yeguas se acercó a los 30 ng/ml, a pesar de que las concentraciones de eCG fueron similares en ambos grupos. En cuanto a las concentraciones de estradiol solo una de las yeguas alcanzó hasta 167 ng/ml y las otras dos estuvieron por debajo de 30 ng/ml. Por otra parte, se observa que en este grupo de yeguas durante la semana 11 de gestación, las concentraciones de estradiol comenzaron a elevarse y continuaron así hasta el final del periodo experimental.

La yegua 3 (figura 15.1) presentó concentraciones bajas de progesterona y eCG. Sin embargo, el número de FAH's que formó fue similar al de las otras yeguas del grupo. El primer folículo anovulatorio que se formó en esta yegua tuvo sus primeras alteraciones desde la semana 8 pero fue hasta la semana 9 de gestación que alcanzó los 36 mm de diámetro y se le aplicó la hCG, durante el mismo periodo de tratamiento. Se observó un aumento en los niveles de estradiol.



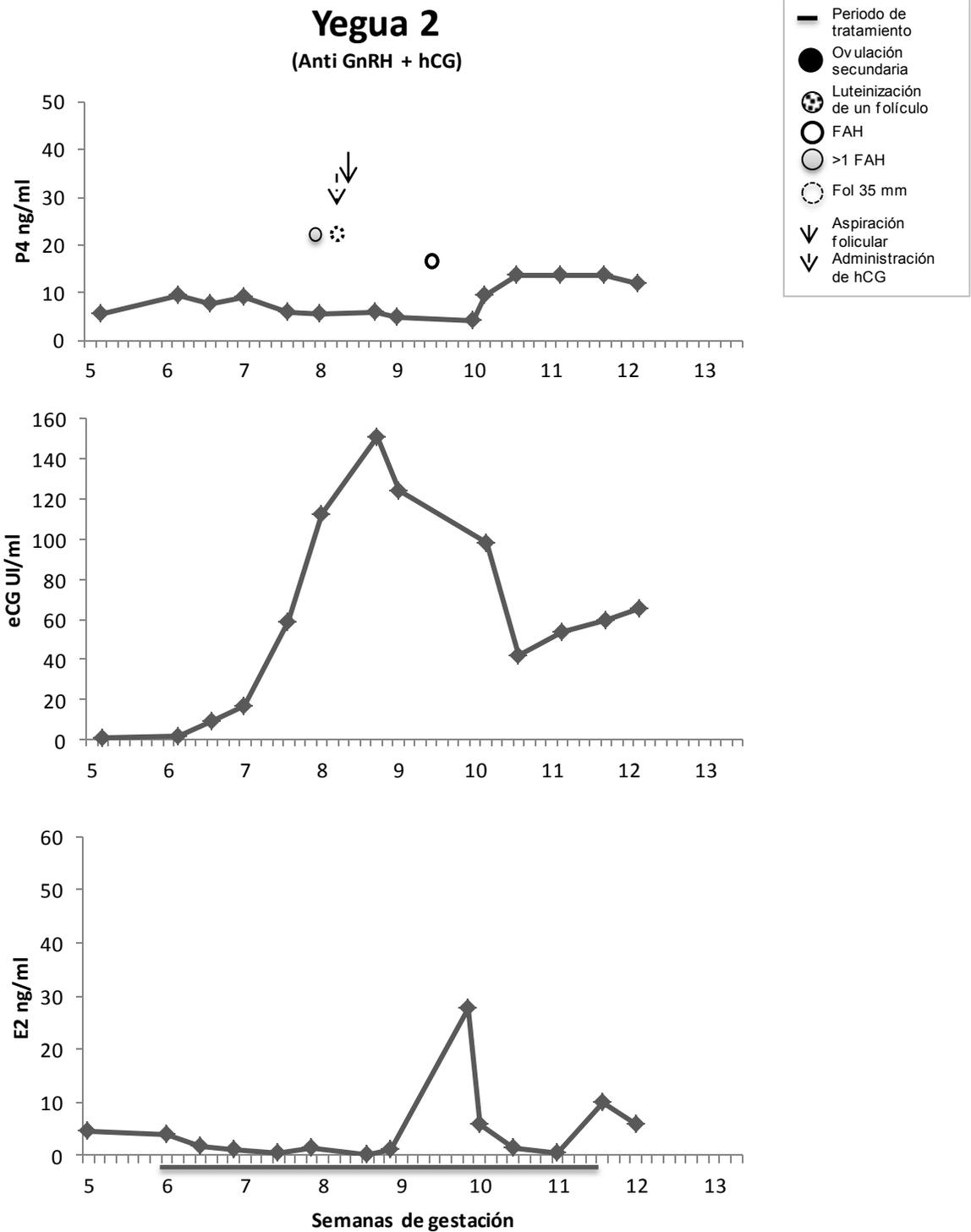
**Figura 15.1** Concentraciones de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina que recibió tratamiento con un antagonista de GnRH.

En la “Yegua 9” durante la semana 8 se aspiró el segundo folículo mayor a 35 mm de diámetro, después de haber recibido el tratamiento con hCG. En la figura 15.2 se observa que la máxima concentración de progesterona alcanzada fue de 28 ng/ml, a diferencia de las otras dos yeguas que apenas rebasaron los 10 ng/ml. La concentración de eCG en general se mantuvo por debajo de 50 UI/ml sin embargo, hubo se observó un pico entre las semanas 7 y 8 coincidiendo con los días de tratamiento con hCG y aspiración. En cuanto a las concentraciones de estradiol se mantuvieron por debajo de 1 ng/ml a excepción de las semanas 8 y 9 en dónde se observó una ligera elevación alcanzando hasta 18 ng/ml.



**Figura 15.2** Concentraciones de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina que recibió tratamiento con un antagonista de GnRH.

En la “Yegua 2” se realizó aspiración en la semana 8 de la gestación posadministración de hCG en el tercer folículo de 35 mm de diámetro que surgió. Las concentraciones de eCG fueron mayores que en las otras dos yeguas del grupo así como el número de FAHs que se formaron aunque solo se limitó a 4 estructuras en total. Pese a ello y contrario a lo esperado la concentración de progesterona producida por esta yegua fue similar al de la “Yegua 3” quien tuvo únicamente 2 FAHs y concentraciones de eCG menores a los 50 ng/ml. En la figura 15.3 se observa que hay un aumento abrupto en los niveles de eCG a partir de la semana 7 de gestación alcanzando un pico de 151 UI/ml en la semana 8 para después descender hasta las 42 UI/ml en la semana 11. El pico observado coincide con los días de tratamiento con hCG y aspiración folicular. Aunado a ello, se puede ver un pico de estradiol en la semana 9 justo después del pico que se dio en la eCG.



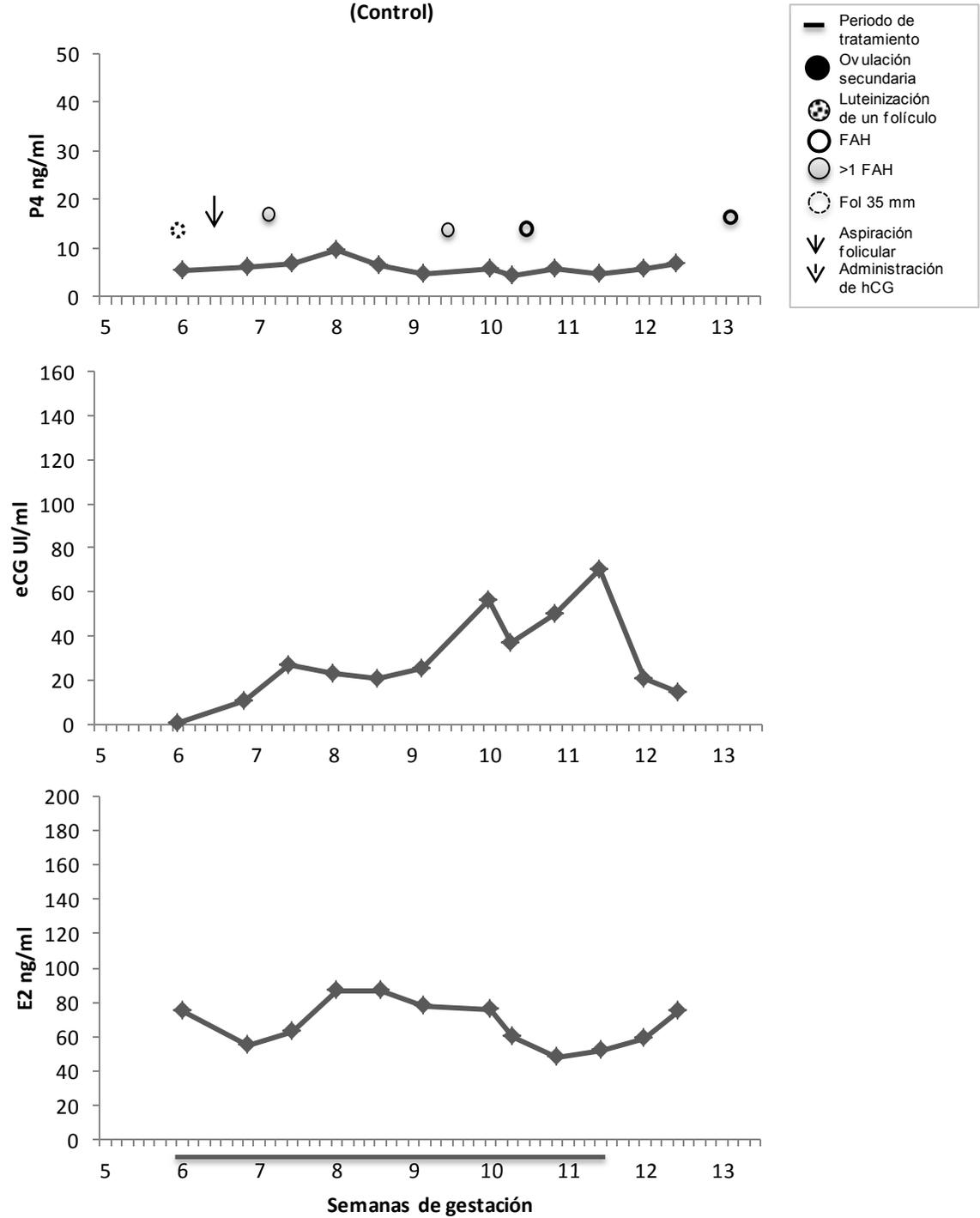
**Figura 15.3** Concentraciones de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina que recibió tratamiento con un antagonista de GnRH.

### 3. Concentración hormonal en yeguas control.

Dado que no hubo tratamiento con antagonista de GnRH se pudo observar que el número de estructuras lúteas formadas fue mayor que en los grupos experimentales ( $p < 0.05$ ). Además, en todas las yeguas se dio una ovulación secundaria excepto en la primera, la cual correspondió al primer folículo aspirado. Las concentraciones de estradiol fueron mayores a 34 ng/ml, en cuanto a la eCG se observó que los niveles máximos fueron de 304 UI/ml. El número de estructuras lúteas entre yeguas fue similar con excepción de la yegua cuya concentración de eCG alcanzó 304 UI/ml y desarrolló 18 estructuras lúteas. Como puede observarse en las figuras 16.1 a 16.4, la aparición de los cuerpos lúteos suplementarios se dio cuando los niveles de eCG aumentaron. Las concentraciones de progesterona fueron similares entre yeguas y solo en la que produjo mayor eCG, la progesterona llegó hasta 75 ng/ml mientras las otras se mantuvieron por debajo de los 20 ng/ml.

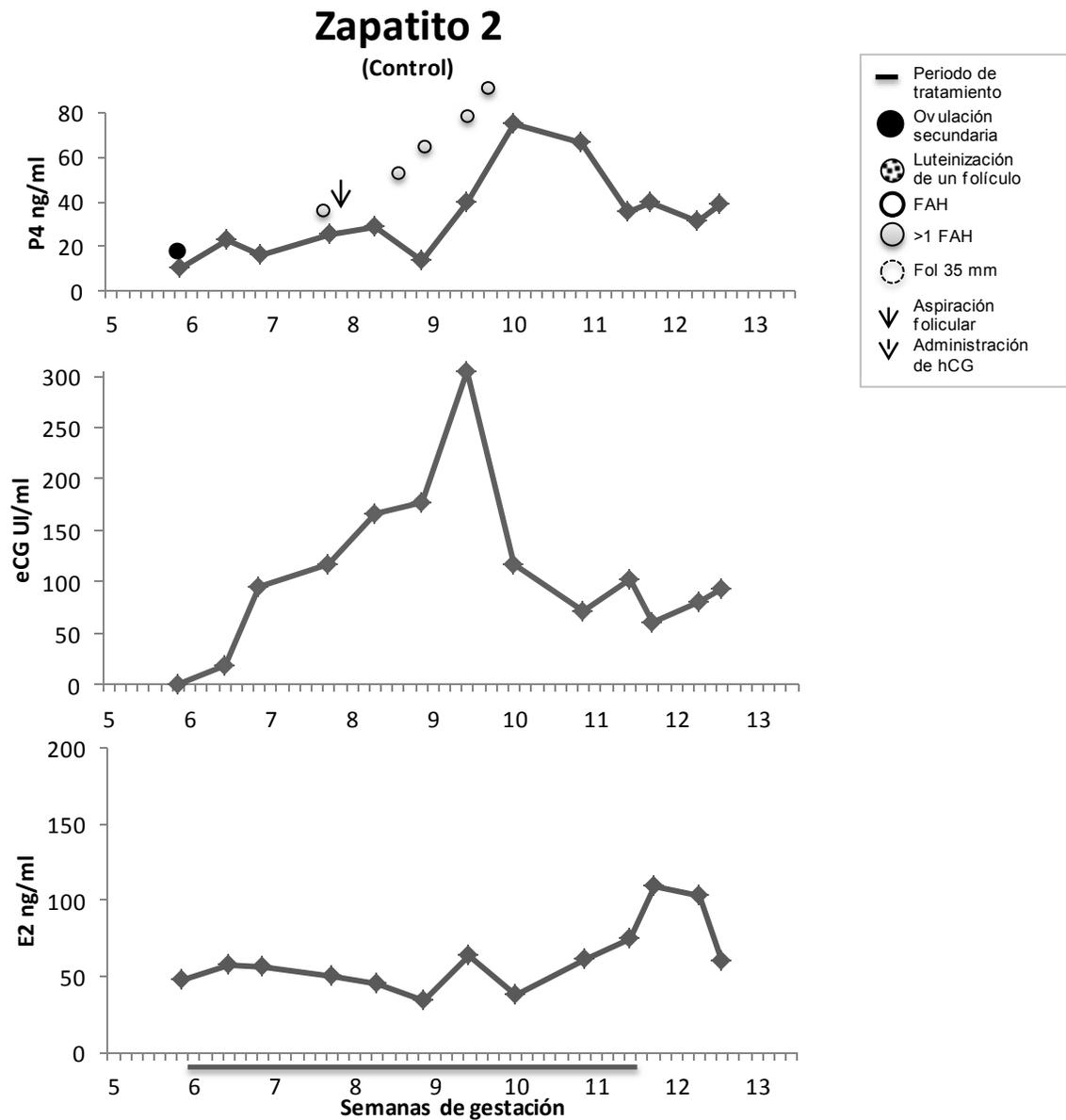
En la yegua “Valentina 2” (figura 16.1) se aspiró el primer folículo que superó los 35 mm de diámetro. En la semana 7 de gestación se empezaron a observar cambios en los folículos que formarían las primeras estructuras lúteas post aspiración folicular sin embargo, fue hasta la semana nueve en que se formaron más cuerpos lúteos accesorios. La aparición de dichas estructuras coincidió con la elevación de eCG que se observó, primeramente, durante la semana siete en la cual sus niveles alcanzaron las 26.4 UI/ml y entre las semanas 9 y 12 en las que la eCG llegó hasta 70 UI/ml.

## Valentina 2 (Control)



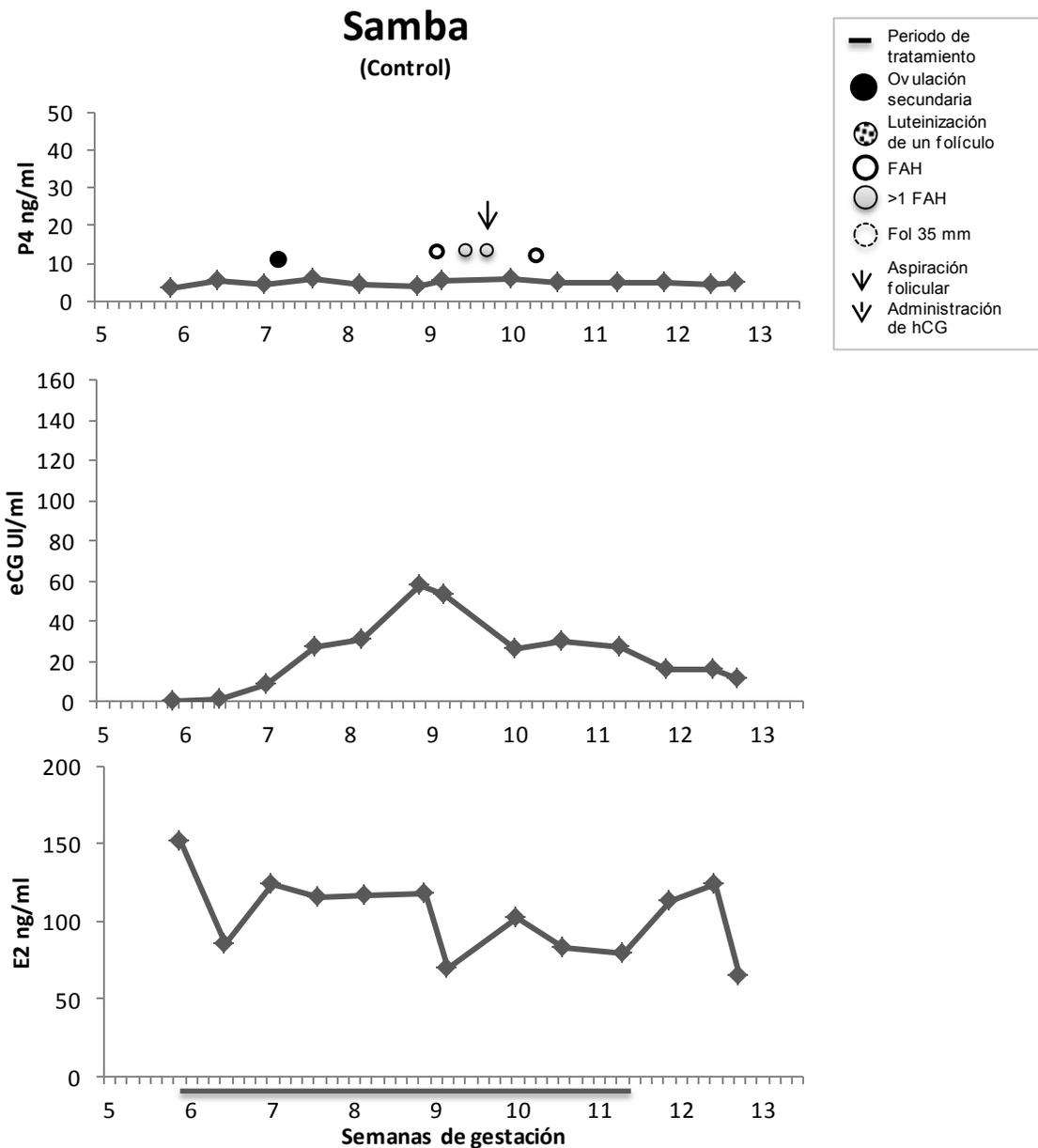
**Figura 16.1** Concentraciones de progesterona, eCG y estradiol.

En la yegua “Zapatito 2” (figura 16.2) se realizó la aspiración del segundo foliculo de 35 mm de diámetro. Sus concentraciones de progesterona, eCG y estradiol así como el número de estructuras lúteas fueron mayores que en el resto de las yeguas control. Durante la semana 10 de gestación se alcanzaron los niveles máximos de progesterona de 75 ng/ml, lo cual coincidió con la presencia de todas las estructuras lúteas formadas. Antecedido por la elevación en las concentraciones de eCG entre la séptima y décima semana de gestación.



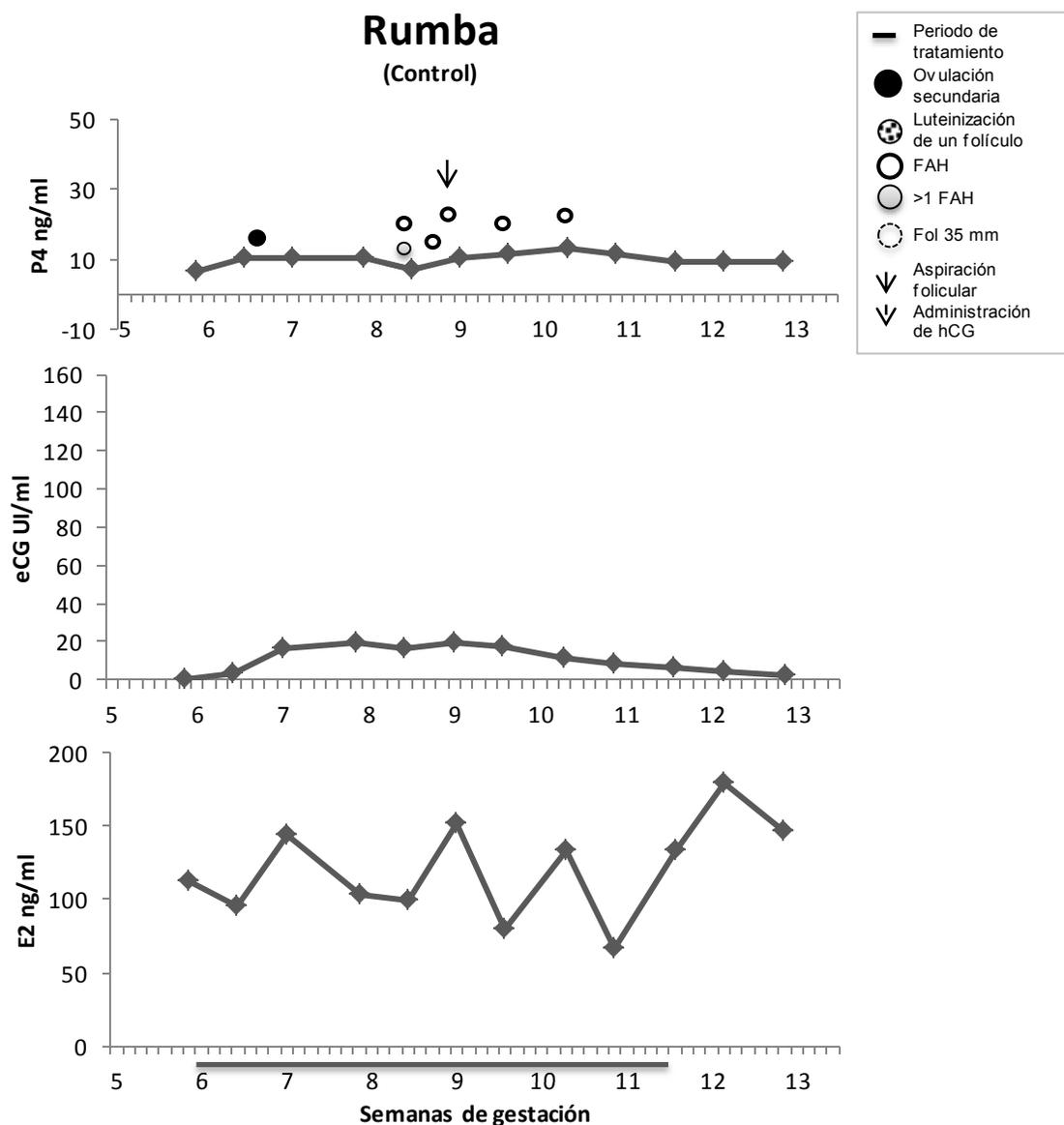
**Figura 16.2** Concentraciones de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina.

En la figura 16.3 se observa que la yegua “Samba”, a diferencia del resto de las yeguas control, presentó concentraciones de progesterona menores alcanzando únicamente 5.82 ng/ml, la formación del cuerpo lúteo secundario se dio en la semana 7 de gestación justo cuando los niveles de eCG comenzaron a incrementarse, la formación de los cuerpos lúteos accesorios se observó durante la novena y décima semana.



**Figura 16.3** Concentraciones de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina.

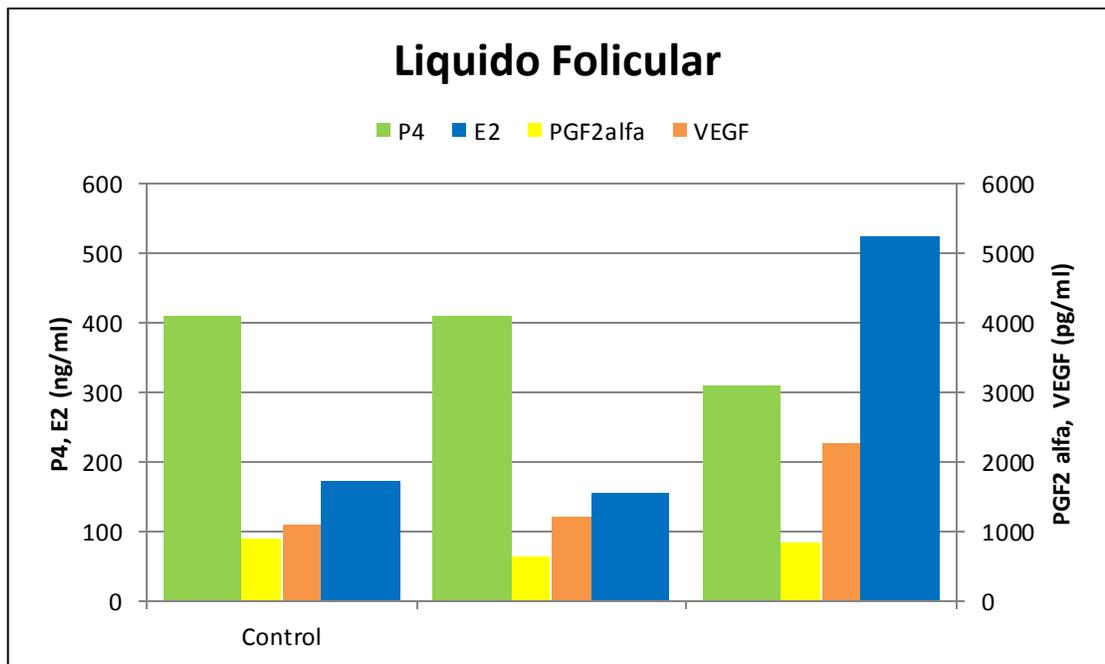
En la yegua “Rumba” se aspiró el tercer folículo de 35 mm de diámetro. La segunda glándula lútea se observó en la semana 6 de gestación y las accesorias durante las semanas 8, 9 y 10. A pesar de que las concentraciones de eCG siempre se mantuvieron por debajo de las 20 UI/ml el número de estructuras lúteas formadas fue similar al de las otras yeguas. Durante la semana 10 las concentraciones de progesterona alcanzaron niveles de 13.42 ng/ml justo después de haberse formado el último cuerpo lúteo accesorio. La concentración de estradiol se mantuvo siempre por arriba de los 60 ng/ml.



**Figura 16.4** Concentraciones de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina.

### G. CONCENTRACIÓN INTRAFOLICULAR DE VEGF, PGF2ALFA, E2 Y P4

Como se observa en la figura 17, tanto la concentración intrafolicular de estradiol como la del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) fueron superiores en las yeguas control alcanzando 522.3 ng/ml y 2,271.1 pg/ml respectivamente, sin embargo la concentración de progesterona fue menor que en las yeguas de los grupos experimentales. En cuanto a las concentraciones de prostaglandina F2 alfa, la diferencia más notoria se observó en el grupo AGhCG que registró 620.6 ng/ml mientras que los otros grupos registraron niveles arriba de los 800 ng/ml.



**Figura 17** Concentración intrafolicular de progesterona, estradiol, factor de crecimiento del endotelio vascular y prostaglandina F2 alfa en los tres grupos de estudio.

## VII. DISCUSIÓN

### A. FORMACIÓN DE CUERPOS LÚTEOS SUPLEMENTARIOS (CUERPOS LÚTEOS SECUNDARIOS Y ACCESORIOS/FAHs)

En trabajos anteriores se ha estudiado el efecto que tienen los antagonistas de GnRH sobre la secreción de gonadotropinas (Garza *et al.*, 1988; Irvine and Alexander, 1993) en el desarrollo folicular y la función lútea (Watson *et al.*, 2000) así como, en el control de la ovulación en asociación o no con hCG (Briant *et al.*, 2004), durante el ciclo estral. Sin embargo, no se habían usado en yeguas gestantes, las cuales resultan en un modelo ideal ya que de manera natural forman folículos anovulatorios hemorrágicos (cuerpos lúteos accesorios).

La ovulación es dependiente de LH (Ginther, 1992c), y los resultados obtenidos en el presente trabajo lo confirmaron, ya que al administrar el antagonista de GnRH diariamente durante siete días seguidos de la administración semanal por cinco semanas, provocó fallas en la ovulación de folículos preovulatorios coincidiendo con estudios previos en los que el antagonista eliminaba los pulsos de secreción de LH (Watson *et al.*, 2000; Briant *et al.*, 2004) y evitaba la ovulación de folículos preovulatorios (Costilla, 2011).

La condición anovulatoria de dichos folículos se asoció más a la supresión de la hormona luteinizante y no tanto a la de FSH a pesar de que tienen una fuerte correlación con la liberación de GnRH (Irvine and Alexander, 1993). Esto pudo demostrarse en yeguas ovariectomizadas que fueron inmunizadas activamente contra GnRH; donde la secreción de LH se redujo entre un 90% y 100% mientras que la FSH se redujo únicamente en un 50% sugiriendo que su secreción es controlada solo en parte por la GnRH (Garza *et al.*, 1988).

Debido a que la supresión de la LH hipofisaria evitó la ovulación secundaria en las yeguas del grupo AG y AGhCG, fue hasta la semana 8 de gestación que comenzaron a formarse los cuerpos lúteos accesorios/FAHs por efecto de la secreción de eCG mientras que en el caso de las yeguas del grupo control (C) las estructuras lúteas suplementarias se dieron desde la semana 6 de gestación. Y

fue hasta la semana 9 en la que, como resultado de la sinergia entre la LH y eCG, el grupo control acumuló mayor número de estructuras lúteas accesorias.

Además de ser la responsable del mantenimiento de la función lútea hasta la resurgencia de la glándula lútea (Ginther, 1992; Boeta y Zarco, 2012) e indispensable para la ovulación secundaria (Costilla, 2011), la LH hipofisiaria parece ser necesaria también para la mayor formación de cuerpo lúteo accesorios. Esto se demuestra en el presente trabajo ya que el grupo control formó considerablemente mayor número de cuerpos lúteos accesorios que los grupos AG y AGhCG. Así mismo, mostró tener la capacidad de llevar a los folículos hasta su completa luteinización en menor tiempo que la eCG, de modo que el periodo que transcurrió desde que se observaron los primeros cambios en el antro folicular de los futuros FAHs/cuerpos lúteos accesorios hasta su completa luteinización en el grupo grupo C fue en promedio de 8 días y en los grupos AG y AGhCG fue de 9.4 días.

## B. CARACTERIZACIÓN DE FOLÍCULOS ANOVULATORIOS HEMORRÁGICOS/CUERPOS LÚTEOS ACCESORIOS

Son pocos los trabajos en los que se ha empleado un antagonista de GnRH durante la gestación equina para el estudio de los folículos anovulatorios hemorrágicos (Costilla, 2011; Calderón, 2012) y hasta donde se sabe, éste es el único en que además, se ha caracterizado la formación de los FAHs.

En los trabajos realizados anteriormente se han empleado diferentes métodos para la inducción de folículos anovulatorios hemorrágicos y en diferentes momentos del ciclo estral, entre ellos se encuentra la inducción por aspiración folicular durante periodos interovulatorios (Ginther *et al.*, 2006; Ginther *et al.*, 2008) y la inducción por administración de un inhibidor de prostaglandinas en asociación con hCG en un folículo preovulatorio (Ginther *et al.*, 2011; Cuervo-Arango, 2011; Cuervo-Arango y Domingo-Ortiz, 2011; Cuervo-Arango *et al.*, 2011; Cuervo-Arango *et al.*, 2012).

Aunque en todos ellos los folículos anovulatorios hemorrágicos siguen un patrón de formación similar que incluye la aparición de un folículo preovulatorio, seguido de la aparición de múltiples partículas ecogénicas en el antro folicular las cuales aumentan al paso de las horas, aparición de bandas ecogénicas que se tornan posteriormente en redes, engrosamiento de la pared folicular correspondiente con la luteinización del folículo (Ginther *et al.*, 2006; Ginther *et al.*, 2008; Ginther *et al.*, 2011; Cuervo-Arango, 2011; Cuervo-Arango y Domingo-Ortiz, 2011; Cuervo-Arango *et al.*, 2011; Cuervo-Arango *et al.*, 2012); las características a la ultrasonografía de los FAHs que pueden encontrarse varían de acuerdo al estímulo hormonal bajo el que se encuentren tal es el caso de un patrón de formación más descrito por Ginther *et al.*, (2006) en el cual el folículo en el día 0, considerado como el día en que se esperaba la ovulación, mostró una excesiva cantidad de partículas ecogénicas en el antro, al día 1 la granulosa se veía engrosada aparentemente por el inicio de su luteinización, luego al segundo día mostró un área de aparente sedimentación celular en el lado izquierdo y en su lado derecho múltiples partículas ecogénicas que finalmente, para el día 4 se tornaron en una red de bandas ecogénicas y el área de sedimentación en una estructura firme.

Igualmente Cuervo-Arango y Newcombe (2012) describieron tres morfologías de FAHs (similar a redes, sólido y mixto) siendo el “similar a redes” el más común con un 54% de aparición. Esto es consistente con el presente trabajo debido a los cuatro patrones de formación de FAHs observados que, además del clásico, incluye morfologías como las descritas por Cuervo-Arango y Newcombe (2012) y a que la secuencia de formación clásica fue la que predominó sin embargo, difiere en cuanto al orden de presentación de los cambios y al diámetro en el que comienzan a verse las alteraciones ya que las primeras se reportan en folículos desde 40 mm de diámetro (Ginther *et al.*, 2006) y en el presente estudio se observaron en folículos de 20-25 mm; y al diámetro máximo alcanzado el cual en promedio va de 56-69 mm (Ginther *et al.*, 2006; Cuervo-Arango *et al.*, 2011) pero que puede llegar hasta 80 mm (Ginther *et al.*, 2006) y en el presente estudio solo

el 19% de los FAHs alcanzaron diámetros mayores a 50 mm de modo tal que los máximos diámetros estuvieron entre 35-45 mm en 34% de los FAHs.

Se ha sugerido que los cambios observados a la ultrasonografía en los FAHs resultan por la alteración en la acción del anticoagulante similar a la heparina presente en el líquido folicular (Ginther, 1992). Ginther *et al.*, (2006) compararon el flujo sanguíneo de la pared folicular en el día -1 (0=día de la ovulación) en folículos que ovularon y folículos que formaron FAHs encontrando que el flujo era mayor en FAHs (90%±4%) que en el grupo control (69%±7%). Sin embargo, la evaluación del flujo sanguíneo de la pared folicular mediante ultrasonografía doppler a color realizada cada 24 horas en el presente trabajo no fue de utilidad para predecir si un folículo preovulatorio ovularía o formaría un FAH.

El incremento en la proporción de flujo sanguíneo de la pared folicular en el día -1 en yeguas con un futuro FAH se ha atribuido particularmente a la vascularización de la pared folicular en el área de la ovulación esperada (área apical) pero no en yeguas que ovulan. Es decir, la ausencia o presencia de flujo sanguíneo en el área apical de una futura ovulación o FAH, respectivamente, es compatible con una mínima hemorragia durante la ovulación y una gradual pero masiva hemorragia durante la formación del FAH (Ginther *et al.*, 2006).

### C. EFECTO DEL ANTAGONISTA DE GNRH EN ASOCIACIÓN CON HCG EN LA FORMACIÓN DE FOLÍCULOS ANOVULATORIOS HEMORRÁGICOS

Como es sabido, la ovulación involucra el colapso de un folículo preovulatorio con la evacuación de líquido folicular y la liberación del ovocito (Cuervo-Arango *et al.*, 2011) y es desencadenada por el surgimiento preovulatorio de LH (Robker *et al.*, 2000). En la yegua, para inducir dicho surgimiento se ha empleado una hormona de origen humano denominada hCG, ésta tiene actividad de LH (Sirois y Dore, 1997; Barbaccini *et al.*, 2000) y al administrarla a una dosis de 1500-3000 UI en yeguas con folículos  $\geq 35$  mm, se espera la ovulación entre las 36 y 42 horas después del tratamiento. Sin embargo, en este trabajo ninguno de los folículos preovulatorios que recibieron el tratamiento con hCG evitaron su conversión a

FAHs. Es probable que los folículos ya hubiesen sido afectados por la acción del antagonista de GnRH desde la desviación (folículos desde 19 mm) por lo que al llegar a un tamaño de folículo preovulatorio la hCG no pudo revertir dichos daños y el folículo falló en la ovulación y se convirtió en FAH. Esto pudiese sugerir que el efecto que tiene dicha hormona sobre la ovulación no es suficiente por sí mismo de modo que, depende principalmente del efecto directo que ejerce sobre la LH, al estimular su rápido incremento dentro de las 24 horas post tratamiento (Priddy *et al.*, 1993), para que ésta sea la que desencadene la ovulación. Esto a su vez muestra de nuevo que la LH es necesaria para la ovulación (Ginther, 1992c; Costilla, 2011; Calderón, 2012).

La falta de efecto de la hCG puede explicarse como consecuencia de la administración del antagonista de GnRH ya que al ser administrado a una concentración alta y constante provocó la disminución de los receptores (regulación a la baja) a GnRH y por tanto su desensibilización por la internalización del receptor y modificaciones en los segundos mensajeros (Wang, 2001; Brothers, 2002; Neil, 2002) evitando que se pudiese dar la señalización para el aumento preovulatorio de LH aunado a que en el momento de la administración de hCG la LH basal ya había sido bloqueada por el mismo antagonista de GnRH (Garza *et al.*, 1988). Por otra parte, es probable que el o los factores que desencadenan la formación de un FAH ya estuvieran presentes en los folículos en el momento del tratamiento con hCG ya que, como se mencionó anteriormente, varios de ellos mostraban alteraciones en el antro, como excesivo puntilleo ecogénico, desde los 20-25 mm y algunos alcanzaban como diámetro máximo 35 mm siendo éste el recomendado para recibir el inductor de la ovulación y por ello no se evitó la formación del FAH. Nuevos protocolos tendrían que diseñarse para evaluar el efecto de la gonadotropina coriónica humana en los folículos anovulatorios hemorrágicos.

#### D. RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN HORMONAL DE P4, ECG Y E2 CON LA FORMACIÓN DE CUERPOS LÚTEOS ACCESORIOS/FAHS

Como era de esperarse la concentración de eCG en las yeguas del presente estudio no fue afectada por la administración del antagonista de GnRH ya que su secreción, dada por las copas endometriales, es autónoma y no depende del control hipotalámico o de la retroalimentación negativa con esteroides sexuales (Allen y Moore, 1972; Murphy y Martinuk, 1991) por lo que no hubo diferencia significativa entre los grupos de estudio ( $p > 0.05$ ).

Por otra parte, aunque no se midió la secreción de LH se asume que la administración del antagonista de GnRH resultó en la completa supresión de LH ya que su grado de dependencia hacia la GnRH es de un 90% a 100% (Garza *et al.*, 1988; Irvine and Alexander, 1993; Watson *et al.*, 2000; Briant *et al.*, 2004).

El presente trabajo es consistente con estudios previos en los que se ha reportado el efecto luteogénico de la eCG (Allen, 2001b; Boeta y Zarco, 2012) ya que a pesar de haber inhibido la secreción de LH basal mediante la administración de un antagonista de GnRH (Garza *et al.*, 1988), la formación de estructuras lúteas accesorias no cesó y se dio a partir de la semana 8 de gestación mientras que el efecto luteotrópico ejercido por la eCG en el cuerpo lúteo primario también se presentó entre los días 35-38 de gestación con el aumento en las concentraciones de progesterona (Allen, 1984; Boeta y Zarco, 2005; Boeta y Zarco, 2012).

Sin embargo, al comparar el número de cuerpos lúteos accesorios formados por el grupo control y los formados por los grupos que recibieron el antagonista de GnRH, se observó que aún con la presencia de eCG se requiere de LH hipofisiaria para que se dé la ovulación secundaria (Costilla, 2011) y la formación de un mayor número de estructuras lúteas accesorias.

Así como Boeta y Zarco (2012) concluyeron que la secreción de eCG al estimular tanto el desarrollo de cuerpos lúteos suplementarios como la función del cuerpo lúteo primario, lleva a un aumento en la secreción de progesterona y éste podía ser significativamente mayor en las yeguas que formaran mayor número de estructuras lúteas accesorias, se observó la misma correlación entre la secreción

de progesterona y el número de cuerpos lúteos accesorios o FAHs formados, de manera que el grupo control, el cual predominó en número de estructuras, tuvo mayor secreción de progesterona, seguido por el grupo AG y luego por el grupo AGhCG (Figuras 1.2 y 11.2).

La diferencia en secreción de progesterona no fue estadísticamente significativa entre el grupo Control y el grupo AG ( $p > 0.05$ ) no obstante, el número de cuerpos lúteos accesorios/FAHs entre grupos sí lo fue ( $p < 0.05$ ). Por otra parte, la diferencia tanto en secreción de progesterona como en el número de Cuerpos lúteos accesorios/FAHs fue claramente marcada entre los grupo AGhCG y Control ( $p < 0.05$ ). Finalmente la diferencia estadísticamente significativa entre los grupos AG y AGhCG se dio únicamente en la secreción de progesterona.

Lo cual lleva al supuesto de que las yeguas que forman tres cuerpos lúteos tienen mayor producción de progesterona que las que forman dos o menos cuerpos lúteos, sin embargo, no hay diferencia en la secreción de progesterona entre las yeguas que forman tres cuerpos lúteos accesorios/FAHs o más. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos por Boeta y Zarco (2012) quienes además de asociar el número de estructuras lúteas con la concentración de progesterona encontraron que la yeguas que formaban un tercer cuerpo lúteo accesorio tenían mayores niveles de eCG que aquellas en las que solo se formaba uno o dos cuerpos lúteos accesorios. Cabe señalar que en éste estudio, los tres grupos de yeguas tuvieron concentraciones similares de eCG por lo que la diferencia entre el número de estructuras lúteas formadas entre los grupos con antagonista de GnRH y el grupo Control fue atribuida a la presencia de las LH hipofisiaria en este último grupo.

Aunque la concentración de progesterona en el grupo control fue mayor que en los demás grupos se sugiere que las yeguas con FAHs tienen mayor capacidad de producción de progesterona ya que con presentar exclusivamente tres estructuras lúteas fueron capaces de equiparar la producción de progesterona del grupo control el cual aparentemente tenía ventaja por contar con el doble de estructuras. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Calderón (2012) quien

encontró que en yeguas gestantes tratadas con un antagonista de GnRH las concentraciones de progesterona fueron más altas que en el grupo testigo a partir de la semana 8 de gestación, constituyendo un efecto paradójico, en el que la supresión de una hormona luteotrópica (LH) resultó en una mayor producción de progesterona. Pero contrastan con Cuervo-Arango *et al.*, (2011) en cuyo estudio se encontró que la producción de progesterona en yeguas no gestantes que desarrollaron FAHs era menor que las del grupo control asociando la baja concentración de progesterona a la reducida vascularización del tejido lúteo en desarrollo del FAHs comparado con el cuerpo lúteo originado por el colapso de un folículo; y con los trabajos de Watson *et al.*, (2000) y Briant *et al.*, (2003) en los que la administración de un antagonista de GnRH en yeguas vacías resultó en una disminución de las concentraciones de progesterona. Aunque es evidente que por ser yeguas vacías carecían de eCG y a su vez de LH por el efecto del antagonista de GnRH, por lo que no había ninguna hormona que aportara ese efecto luteotrópico resultando en bajas concentraciones de progesterona.

El hecho de que las yeguas gestantes del grupo AG (eCG), produjeran pocas estructuras lúteas con concentraciones de progesterona similares a las yeguas del grupo control (LH+eCG) con mayor número de estructuras lúteas sugiere que, aunque se ha reportado que ambas hormonas (LH y eCG) poseen un efecto luteogénico y luteotrópico (Brian *et al.*, 2003; 2004; Ginther, 1992c; Boeta y Zarco, 2010; 2012; Costilla, 2011; Calderón, 2012) una de ellas (LH) posee ambos y la otra (eCG) solo uno efecto. Así la LH hipofisiaria podría ser mayormente luteogénica que luteotrópica esto se deduce inicialmente de que solo se requiere una pequeña concentración de ella para inducir la ovulación (Brian *et al.*, 2003; 2004) a su vez, si se carece de LH durante la gestación, como se demostró por la administración de un antagonista de GnRH, se suprime la ovulación secundaria (Costilla, 2011; Calderón, 2012) y el número de estructuras lúteas accesorias (FAHs) formado es menor, por otra parte la diferencia que hubo entre el grupo control y los grupos con antagonista de GnRH en cuanto al periodo de formación de los FAHs, 8 y 9.4 días respectivamente, son otro indicativo del mayor efecto

luteogénico de la LH, finalmente a que la inducción de FAHs en yeguas vacías resulta en concentraciones menores de progesterona a las producidas por yeguas que presentan ovulaciones normales (Ginther *et al.*, 2006; Cuervo-Arango *et al.*, 2011b). Por el contrario, en el presente trabajo, la eCG parece ser exclusivamente luteotrópica al inducir mayor producción de progesterona por parte de los FAHs (Calderón, 2012), pero menor número de ellos en gestaciones equinas carentes de LH por efecto de un antagonista de GnRH.

La concentración de LH presente antes de la ovulación es suficiente para desencadenarla, una vez dada la ovulación los niveles de LH inician su descenso hasta llegar a nivel basal el cual es suficiente para ejercer un efecto luteotrópico en el cuerpo lúteo y mantenerlo hasta la secreción de PGF2alfa y el reinicio del ciclo. Sin embargo, en un folículo destinado a convertirse en FAH, las concentraciones de LH que han iniciado su descenso no son suficientes para culminar la ovulación por lo que se mantiene únicamente su efecto luteotrópico y el folículo continúa creciendo hasta luteinizarse mostrando que parece haber solo un mínimo requerimiento de LH para la luteinización de las células foliculares y la subsecuente producción de progesterona (Cuervo-Arango *et al.*, 2011b).

Durante los primeros 35 días de la gestación la LH basal no es suficiente para continuar con el desarrollo y ovulación de los folículos resultantes del continuo surgimiento de oleadas estimulado por la secreción de FSH, sino hasta que comienza la secreción de eCG y la sinergia de ambas lleva a la ovulación secundaria de la gestación aunque las concentraciones de eCG apenas estén aumentando. Posteriormente, una vez que la concentración de eCG ha alcanzado su máximo nivel inicia la formación de cuerpos lúteos accesorios, es decir, la luteinización de folículos sin previa ovulación. En este caso la anovulación de folículos, pese a las altas concentraciones de eCG y la presencia de LH basal, puede deberse a que estuvieron, desde su reclutamiento, bajo el efecto de la eCG. Recientemente se ha encontrado una asociación entre el incremento en la concentración de LH desde etapas tempranas de desarrollo folicular y el posterior desarrollo de FAHs en yeguas (Ginther *et al.*, 2008c) al recibir tratamiento con

PGF2 alfa (Ginther *et al.*, 2007b), la LH continúa incrementando en asociación con la luteólisis hasta su surgimiento ovulatorio como resultado de la caída en la concentración de progesterona y la subsecuente remoción de la retroalimentación negativa que la progesterona ejerce sobre la LH (Ginther *et al.*, 2008c).

En las yeguas control, las oleadas foliculares que continuaron presentándose cada 10-12 días por efecto de la FSH (Gigli *et al.*, 2006; Ginther, 1992) comenzaron a secretar estradiol el cual al seguir aumentando debería promover el incremento en la secreción de LH sin embargo, al encontrarse basal la LH por la retroalimentación negativa que ejerce la progesterona sobre ella (Gigli *et al.*, 2006; Ginther, 1992) es probable que el estradiol continuara aumentando, por efecto de la eCG, la FSH y la LH basal en conjunto, además de que al no presentarse el aumento de la LH ésta no pudo ocupar sus receptores en las células de la granulosa y por tanto no se pudo dar el estímulo para que el estradiol iniciara su descenso (Russell y Robker, 2007; Espey, 1994) y siguió secretándose hasta que las células de la granulosa se luteinizaron y la producción de estradiol fue sustituida por la de progesterona (Tamanini y De Ambrogi, 2004) recordando que para ello el colapso folicular no es necesario (Cuervo-Arango *et al.*, 2011).

#### E. PERFILES HORMONALES Y FORMACIÓN DE CUERPOS LÚTEOS ACCESORIOS

Como es sabido, la eCG proveniente de las copas endometriales se produce a partir del día 35 de gestación y actúa en los mismos receptores de LH de las células del folículo (Ginther, 1992c; Saint-Dizier *et al.*, 2003) sin embargo, la afinidad de eCG por el receptor es mucho menor que la de LH debido a las diferencias en la glicosilación de ambas hormonas (Martinuk *et al.*, 1991) de manera que se necesitan altas concentraciones de eCG para ejercer control en la fisiología ovárica (Murphy y Martinuk, 1991) y solo una baja concentración de LH para que se dé tanto el crecimiento terminal del folículo preovulatorio (Brian *et al.*, 2004) como la ovulación (Brian *et al.*, 2003) además, la vida media de la LH en la yegua es mayor que en otras especies durando aproximadamente 5 horas lo que

conlleva a que la supresión profunda de LH, con la administración de un antagonista de GnRH, se dé más allá de ese periodo (Irvine, 1979; Hodges *et al.*, 1988; Cetel *et al.*, 1983). Con base en lo anterior y considerando la presencia de un folículo preovulatorio en yeguas del grupo AG, es que se pueden explicar las ovulaciones observadas al inicio del tratamiento en algunas de ellas. Es decir, debido a que dos de las yeguas tenían en ese momento un folículo lo suficientemente grande que tuviese los receptores y las condiciones hormonales adecuadas, es que se dieron las ovulaciones secundarias aun con el tratamiento del antagonista de GnRH.

Boeta y Zarco (2012) mostraron que la eCG tiene la capacidad de mantener la función lútea del cuerpo lúteo primario y estimular el desarrollo de nuevas estructuras lúteas. Sin embargo observaron que en algunas yeguas con gestación equina podían tener bajas concentraciones de eCG y por lo tanto menor número de estructuras lúteas. Esto es consistente con la formación de FAHs y la producción de progesterona en algunas yeguas del grupo AG (Figuras 19.1-19.4 anexo) cuya secreción de eCG fue menor a la del resto de las yeguas estudio (A, AGhCG y C) aunque por el solo hecho de ser gestaciones con embrión equino se esperaba que las concentraciones de eCG fueran mayores.

En trabajos anteriores se ha encontrado que dentro de cada tipo de gestación existe variabilidad individual en las concentraciones de eCG (Boeta y Zarco, 2010; 2012), tal variabilidad puede darse a la alza en yeguas que se gestan en el primer parto postparto y en yeguas de tres o más partos posiblemente debido a diferencias en tamaño del útero y la superficie de interacción coriónica endometrial en el momento de la invasión del cinturón trofoblástico (Ginther, 1992; Allen y Wilsher, 2009). También se ha observado que hay yeguas que con bajas concentraciones de eCG son capaces de mantener la gestación independientemente del tipo de embrión que estén portando (Boeta y Zarco, 2005, 2012). Se asumió que dicha variabilidad en las yeguas del presente trabajo con bajas concentraciones de eCG podría deberse al factor “raza” debido a que los animales que presentaron esta condición eran “Pura Sangre Inglés” apuntando

que su producción de eCG es menor que la de hembras criollas o bien, que por el tamaño de las yeguas la concentración de eCG se viese diluida en comparación con las yegua criollas cuya talla es significativamente menor que la de las PSI. Hay yeguas que han demostrado tener la capacidad de mantener la gestación con bajas concentraciones tanto de progesterona como de eCG (Allen *et al.*, 1987) e incluso tener ovulaciones accesorias (Boeta, 2008) atribuyendo tal capacidad a la secreción de LH hipofisiaria la cual es responsable del mantenimiento de la función lútea hasta la resurgencia de la glándula lútea primaria por efecto de la eCG (Ginther, 1992c; Boeta y Zarco, 2012). De modo que en gestaciones mulares (embrión mula) carentes de eCG se han observado ovulaciones accesorias las cuales solamente podrían ocurrir si hubiese existido la secreción en cantidades adecuadas de LH (Boeta, 2008). En el presente estudio, también se observaron yeguas con dichas características, tal es el caso de la yegua “Valentina” la cual perteneció al grupo AG (Figura 19.2) y al grupo C (Figura 16.1) caracterizándose en el primero por la nula producción de FAHs, baja concentración de progesterona y eCG sin embargo, al pertenecer al grupo control formó múltiples cuerpos lúteos accesorios seguramente por efecto sinérgico de la LH hipofisiaria con la eCG ya que las concentraciones de ésta última hormona no fueron notablemente mayores que las que tuvo al pertenecer al grupo AG. Sin embargo la presencia de múltiples cuerpos lúteos accesorios incrementó las concentraciones de progesterona aunque no de la manera en la que se hubiese esperado. Lo anterior sugiere que dichas yeguas dependen fuertemente, además de la secreción de eCG, de la secreción de LH basal para el mantenimiento y formación de estructuras lúteas accesorias.

La LH y eCG ya sea solas o actuando en sinergia son las encargadas del soporte lúteo durante la gestación no obstante, hay casos en los que se reporta el mantenimiento de la gestación con bajas concentraciones de eCG y con la LH basal (Calderón, 2012). En el presente trabajo se tuvo una yegua bajo las mismas circunstancias. La yegua “Alfa” formó parte del grupo AG y del grupo C, en ambas ocasiones tanto la concentración de eCG y progesterona fueron

considerablemente menores al del resto de las yeguas del estudio. En las dos ocasiones formó solo una estructura lútea suplementaria, FAHs y CL respectivamente y aunque se esperaba que como yegua control, con LH hipofisiaria, formara mayor número de estructuras lúteas y tuviera mayor producción de progesterona, no fue así. Esto sugiere que la yegua “Alfa” pudiera ser incapaz genéticamente de producir elevados niveles de eCG para actuar sinérgicamente con la LH para la formación de un mayor número de estructuras lúteas. Una explicación podría ser que es una yegua que desarrolla en forma temprana la capacidad de producir progestágenos en la placenta (Calderón, 2012).

#### F. CONCENTRACIÓN INTRAFOLICULAR DE VEGF, PGF2 ALFA, E2 Y P4

Múltiples son los factores que intervienen en el proceso de ruptura folicular y la subsecuente liberación del ovocito hacia el infundíbulo incluyendo desarrollo vascular y cambio en las concentraciones de líquido folicular (ej. esteroides, citocinas, prostaglandinas, factores de crecimiento, factores angiogénicos) (Ginther *et al.*, 2006) sin embargo, en lo que se refiere a causas directas en la falla en la ovulación se ha hecho hincapié en la función que desempeñan las prostaglandinas (PGF y PGE) (Cuervo-Arango, 2011; Cuervo-Arango *et al.*, 20011) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Ginther *et al.*, 2006). Los cuales son estimulados por la secreción preovulatoria de LH (Gigli *et a.*, 2006).

En el presente trabajo se analizó el líquido folicular obtenido no encontrando diferencias estadísticas en las concentraciones hormonales entre el grupo control y los grupos con antagonista de GnRH. Sin embargo, en el grupo control se registró una tendencia más alta en las concentraciones de estradiol y VEGF lo que sugiere que se debió a la presencia de la LH hipofisiaria.

Ginther *et al.*, (2006) observaron que un día antes de la ovulación esperada había mayor vascularidad en la pared del folículo que estaría involucrado en la conversión de un folículo viable a un folículo anovulatorio hemorrágico. En ese

sentido, la interacción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y sus receptores de membrana VEGFR1 y VEGFR2, se reconoce como la principal estimulación de la angiogénesis tanto en el ovario como en otros tejidos (Redmer *et al.*, 2001) y su producción va a ser estimulada por las gonadotropinas (LH y FSH) y sus homólogas (hCG y eCG) (Barboni *et al.*, 2000).

En el caso de las yeguas tratadas con antagonista de GnRH se registraron concentraciones más bajas de estradiol y VEGF lo que se asocia a la falta de LH hipofisiaria, a pesar de la presencia de eCG, la cual posee una baja afinidad (2-4%) por el receptor de LH (Saint-Dizier *et al.*, 2004), la producción de estradiol y VEGF que estimula es menor a la producida en presencia de LH.

Por otra parte, aunque el grupo C contaba con la secreción de LH hipofisiaria y la concentración de VEGF mayor que la de los grupos con antagonista de GnRH, no presentó ovulaciones accesorias además de la que ocurrió alrededor del día 35 de gestación (ovulación secundaria). Lo cual pudiese sugerir que aunque el VEGF es necesario para el suministro de oxígeno, nutrientes y hormonas al folículo (Berisha *et al.*, 2000) su concentración alta no es el determinante para culminar la ovulación durante la gestación equina. Por lo que su importancia se limita a la promoción de la vasculatura y como factor de sobrevivencia de las células foliculares (principalmente granulosa) (Greenaway *et al.*, 2004).

Las prostaglandinas juegan un rol especial durante el proceso de ruptura folicular (Armstrong, 1981), son producidas por la isoforma 2 de la ciclooxigenasa, también conocida como prostaglandina G/H sintetasa (PGHS-2). Hedin *et al.*, 1987 observaron que al inhibir la actividad de PGHS-2 durante el surgimiento preovulatorio de LH resulte en falla de la ruptura de la pared folicular y su colapso. Con base en ello, se midió la concentración de PGF en el líquido folicular de los tres grupos de estudio encontrando que era muy similar entre ellos además, de no ser consistentes con los obtenidos por Cuervo-Arango *et al.*, (2011) ya que ellos encontraron que la concentración de PGF en el líquido folicular en la yegua incrementaba desde niveles indetectables a las 30 h a 10 ng/ml a las 36 h después del tratamiento con hCG, y en el presente estudio los niveles obtenidos

estuvieron entre 0.62-0.89 ng/ml. Sin embargo, estos resultados no son contundentes ya que es necesario aumentar el número de muestra.

Con base en esto, y aunque las prostaglandinas sean solo un factor de los muchos otros que intervienen en la cascada de eventos que llevan al proceso de ruptura folicular (Robker *et al.*, 2000), se sugiere que éstas pueden tener un papel más relevante en el proceso de la ovulación que el resto de los factores. Cada uno de los grupos del presente estudio se encontraban en condiciones hormonales diferentes (con LH, sin LH, con hCG) para lo cual se esperaban concentraciones intrafoliculares de PGFM diferentes entre grupos o al menos que fueran menores en el grupo AG con respecto a los otros (AGhCG, C) no obstante, las concentraciones de dicha hormona fueron casi iguales. Al haber tal similitud entre ellos, pese a su diferente ambiente hormonal, denota de nuevo el planteamiento de que la exposición de folículos en etapas tempranas de desarrollo a la eCG los pre-sensibiliza o induce un cambio en ellos que les impide culminar el proceso de ovulación cuando han alcanzado la talla adecuada como ocurre con la LH y su asociación para la formación de FAHs (Sirois y Dore, 1997). Las concentraciones del PGFM en los tres grupos se mantuvieron cerca del nivel basal (0.8ng/ml) de acuerdo con Sirois y Dore (1997) quienes mostraron claramente que hay un incremento en la expresión de COX-2 en las células de la granulosa desde las 24 a 39 horas después del tratamiento con hCG. Este incremento en la expresión enzimática fue paralelo con el incremento en sus productos (PGF y PGF) dentro del líquido folicular de modo que la concentración de PGF cambió gradualmente desde niveles basales a las 0 hrs (0.7ng/ml) a un pico (10ng/ml) aproximadamente 36 hrs después de la administración de hCG.

Aunque el VEGF es crucial para el desarrollo folicular y lúteo por el aporte de nutrientes, oxígeno y hormonas no mostró ser un factor desencadenante en la anovulación, ya que a pesar de ser mayor en el grupo control, no se dio mayor número de ovulaciones secundarias por otra parte, se sugiere que la escasa secreción de prostaglandinas a nivel intrafolicular impide la ruptura del folículo y por tanto induce la formación de FAHs.

Se ha establecido la existencia de polimorfismos de LH y que la relativa distribución de isoformas en la circulación así como en la hipófisis depende de la concentración de esteroides en el medio y de la estimulación de GnRH (Ulloa-Aguirre *et al.*, 2001) por lo que es posible atribuir la falta de respuesta intrafolicular para desencadenar la ovulación al tipo de isoformas presentes en el periodo peri-ovulatorio como consecuencia del estímulo hormonal recibido por el folículo durante todo su desarrollo (oleadas presentes entre los 35-120 días de gestación). Esto es apoyado por el hecho de que se han encontrado isoformas de componentes intrafoliculares tales como factores de crecimiento (Gigli *et al.*, 2006), factores angiogénicos (Jia *et al.*, 2001) o bien en gonadotropinas (Alexander e Irvine, 1982) que van cambiando su concentración en el ambiente intrafolicular dependiendo del momento del ciclo en el que se encuentre el folículo. Por lo que es posible que la anovulación esté relacionada con el tipo de isoformas que se producen de LH así como de factores de crecimiento y factores angiogénicos.

## VIII. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo confirman que la eCG por sí sola no es capaz de inducir la ovulación secundaria y requiere de la LH hipofisaria para desencadenarla. De modo que la LH ha mostrado claramente tener un efecto luteogénico y luteotrópico sin embargo, considerando que es necesaria para llevar a cabo la ovulación, aunado a que con su presencia el número de estructuras lúteas accesorias es mayor que el formado por la eCG (actuando sin la sinergia con LH) y que el periodo de formación de cuerpos lúteos es más rápido si la LH está presente se deduce que su efecto es mayormente luteogénico. Por el contrario, la capacidad mostrada por la eCG para inducir mayor secreción de progesterona que la LH y el hecho de que no es capaz de inducir la ovulación, sugiere que su efecto es exclusivamente luteotrópico.

Por otra parte, la conversión en FAH no es exclusiva de folículos de talla preovulatoria ( $\geq 35$  mm) de modo que puede observarse falla en la ovulación de folículos desde 25 mm de diámetro y los patrones de formación pueden variar desde la luteinización espontánea sin evacuación folicular (fols  $< 30$  mm) hasta un patrón de formación clásico que incluye la aparición de abundante puntillado ecogénico en el antro, seguido de la formación de cadenas ecogénicas que después se tornarán en redes para culminar con la completa luteinización del folículo.

La predicción de un futuro FAH a través del seguimiento diario con ultrasonografía doppler a color para la evaluación del flujo sanguíneo presente durante el periodo peri-ovulatorio o peri-FAHs denotó ser insuficiente por lo que un monitoreo realizado en periodos más cortos pudo haber sido de mayor utilidad.

Tanto el antagonista de GnRH como la exposición a eCG pudieron inducir cambios irreversibles en el ambiente intrafolicular desde antes de que el folículo se tornara preovulatorio por lo que el uso de la hCG, para evitar la formación de FAHs, no fue funcional sin embargo, estudios en condiciones hormonales diferentes deben hacerse para confirmar o refutar este hecho.

## **IX. LITERATURA CITADA**

Abulafia O, Sherer DM. Angiogenesis of the ovary. *Am J Obstet Gynecol* 2000; (1Pt 1):240-246.

Alexander SL, Irvine CHG. Radioimmunoassay and invitro bioassay of serum LH throughout the equine oestrous cycle. *J Reprod Fertil Suppl* 1982;32:253–60.

Alexander SL., Irvine CH. FSH and LH. En McKinnon AO, Voss JL (Ed)- *Equine Reproduction*. Lea and Febiger. 1993. Pp 121-132.

Allen WR. Hormonal Control of early pregnancy in the mare. *Animal Reproduction Science*. 1984; 7(1): 283-304.

Allen W.R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction*. 2001; 121: 513-527.

Allen, W.R. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. *Reprod. Domest. Anim*. 2001b; 36: 121–131.

Alonso-Pozos, I, Romano-Pardo M, Gutiérrez-Aguilar C, Ávalos-Rodríguez A, Vergara-Onofre M, Rosado-García A, Rosales-Torres A. Expresión de isoformas del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) durante el desarrollo y atresia folicular en las células de la granulosa y de la teca de los folículo de oveja. Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, Acapulco, Guerrero, México. 2006:204-220.

Armstrong DG. Prostaglandins and follicular functions. *J Reprod Fertil* 1981; 62:283-91.

Armstrong DG., Webb R. Ovarian follicular dominance: The role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev. Reprod*.1997; 2:139-146.

Barbaccini S, Zavaglia G, Gulden P, Marchi V, Necchi D. Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. *Equine Vet Educ* 2000;2:404–8.

Barboni B, Turriani M, Galeati G, Spinaci M, Bacci ML, Forni M, Mattioli M, Vascular endothelial grow factor production in growing pig antral follicles. *Biol Reprod* 2000; 63(3):858-64.

Bergfelt D.R., Pierson R.A. and Ginther O.J. Resurgence of the primary corpus luteum during pregnancy in the mare. *Animal Reproduction Science*. 1989; 21 : 261-270.

Bergfelt DR., Gastal EL. Ginther OJ. Response of estradiol and inhibin to experimentally reduced luteinizing hormone during follicle deviation in mares. *Biol. Reprod*. 2001; 65:426-432.

Bergfelt D.R., Adams G.P. Ovulation and corpus luteum development. In Samper, J.C. *Current-therapy in equine reproduction*. Saunders Company, Elsevier, St. Louis Missouri. 2007; pp. 1-13.

Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Biol Reprod* 2000;63:1106-1114.

Boeta-Acosta AM. Efecto de la época del año sobre la funcionalidad de la scopas endometriales y la secreción de eCG en yeguas utilizadas para la producción de mulas (Tesis Doctorado). México, D., F.: UNAM, 2008.

Boeta-Acosta M, Zarco L. Endocrine alterations around the time of abortion in mares impregnated with donkey or horse semen. *Animal Reproduction Science*. 2010; 121:124-130.

Boeta-Acosta M, Zarco L. Luteogenic and luteotropic effects of eCG during pregnancy in the mare. *Animal Reproductions Science*. 2012; 4478: 1-6.

Bousfield GR, Liu WK, Sugino H, Ward DN. Structural studies on equine glycoprotein hormones. Amino acid secuencia of equine lutropin  $\beta$ -subunit. *J Biol. Chem*. 1987; 262: 8610-8620.

Briant C, Ottogalli M, Morel M, Guillaume D. use of a GnRH antagonist, antarelix, associated or not with Hcg, to control ovulation in cyclic pony mares. *Domestic Animal Endocrinology*, 2003. 24:305-322.

Briant c, Ottogalli M, Guillaume D. Attempt to control the day of ovulation in cycling pony mares by associating a GnRH antagonist with hCG. *Domestic Animal Endocrinology*. 2004; 27:165-178.

Brothers SP, Janovick JA, Maya-Nunez G, Cornea A, Han XB, Conn PM. Conserved mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor carboxyl

terminal amino acids regulate ligand binding, effector coupling and internalization. *Mol Cell Endocrinol.* 2002; 190:19-27.

Cetel NS, Ribvier J, Vale W, Jen SSC. The dynamics of gonadotropin inhibition in women induced by an antagonistic analogy of gonadotropin-releasing hormone. *Clin Endocrinol Metab*, 1983-, 57:62-65.

Chedrese J. Regulación autocrina y paracrina del desarrollo folicular I: Efectos de los esteroides. *Rev Col Cienc Pec* 2003;16:171-182.

Conn PM, Freeman ME. *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine.* Human Press, Totowa. N. Jersey. 2000.

Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular Research.* 2001; 49: 507–521.

Costilla CA. Desarrollo folicular en gestaciones equinas y mulares tratadas con un antagonista de GnRH (tesis de maestría). México, D.,F: UNAM, 2011.

Cuervo-Arango J. The effect of treatment with flunixin meglumine at different times relative to hCG administration on ovulation failure and luteal function in mares. *Animal Reproduction Science.* 2011; 127:84-90.

Cuervo-Arango J, Domingo-Ortiz R. Systemic treatment with high dose of flunixin-megumine is able to block a ovulation in mares by inducing hemorrhage and luteinisation of follicles. *Theriogenology*, 2011. 75:707-714.

Cuervo-Arango J, Beg MA, Ginther OJ. Follicle and systemic hormone interrelationships during induction of luteinized unrupted follicles with a prostaglandin inhibitor in mares. *Theriogenology*, 2011b: 76: 361-373.

Cuervo-Arango J., Newcombe J. R. Ultrasound characteristics of experimentally induced luteinized unruptured follicles (LUF) and naturally occurring hemorrhagic anovulatory follicles (FAH) in the mare. *Theriogenology.* 2012; 77:514-524.

Donadeu FX, Ginther OJ. Effect of number and diameter of follicles on plasma concentrations of inhibin and FSH in mares. *Reproduction.* 2001; 121:897-903.

Ealy A.D., Eroh M.L., Sharp D.C. Prostaglandin H synthase type 2 is differentially expressed in endometrium based on pregnancy status in pony mares and responds to oxytocin and conceptus secretions in explant culture. *Animal Reproduction Science*, 2010;117:99-105.

Elter K, Nelson LR. Use of third generation gonadotropin-releasing hormone antagonists in in vitro fertilization-embryo transfer: a review. *Obstet Gynecol Surv.* 2001; 56: 576-88.

Espey LL. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod* 1994;50:233-238.

Evans AC., Fortune JE. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology.* 1997; 138:2963-2971.

Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical progress. *Endocrine Reviews* 2004;25:581-611.

Ferreira J.C., Ignácio F.S. & Meira C. Doppler ultrasonography principles and methods of evaluation of the reproductive tract in mares. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2011. 39 (Suppl 1): s105 - s111

Fraser HM, Lunn SF, Kim H, Duncan WC, Rodger FE, Illingworth PJ, Erickson GF. Changes in insulin-like growth factor-binding protein-3 messenger ribonucleic acid in endothelial cells of the human corpus luteum: a possible role in luteal development and rescue. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1672-1677.

Garza F, Thomson DL, Mitchell PS, Wiest JJ. Effects of active immunization against gonadotropin-releasing hormone on gonadotropin secretion after ovariectomy and testosterone propionate administration to mares. *J. Anim Sci*, 1998; 66:479-486.

Gastal EL., Gastal M.O., Ginther OJ. Experimental assumption of dominance by a smaller follicle and associated hormonal changes in mares. *Biol. Reprod.* 1999; 61:724-730.

Gastal EL., Gastal MO., Beg MA., Ginther OJ. Interrelationships among follicles during the common-growth phase of a follicular wave and capacity of individual follicles for dominance in mares. *Reproduction.* 2004; 128:417-422.

Gigli I., Russo A., Agüero A. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *In vet.* 2006; 8: 183-204.

Ginther OJ. *Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects*, 2a ed. Cross Plain: Equiservicies. 1992.:419-456

- Ginther OJ, Bergfelt DR. Associations between FSH concentrations and major and minor follicular waves in pregnant mares. *Theriogenology* 1992; 38: 807-821.
- Ginther OJ. Characteristics of the ovulatory season. In: *Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects*. Cross plains: Equiservices;1992c. P.173-232.
- Ginther, OJ. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61:61-79.
- Ginther OJ., Beg MA., Bergfelt DR., Donadeu FX., Kot K. Follicle selection in monovular species. *Biol. Reprod.* 2001; 65:638-647.
- Ginther OJ., Beg MA., Donadeu FX. and Bergfelt DR. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim. Reprod. Sci.* 2003; 78:239-257.
- Ginther OJ., Bergfelt DR., Beg MA., Meira C., Kot K. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. *Biol. Reprod.* 2004; 70:99-105.
- Ginther OJ., Gastal EL., Gastal MO., Checura CM. Beg MA. Dose-response study of intrafollicular injection of insulinlike growth factor-i on follicular fluid factors and follicle dominance in mares. *Biol. Reprod.* 2004; 70:1063-1069.
- Ginther OJ., Gastal EL., Gastal MO., Beg MA. Seasonal influence on equine follicle dynamics. *Anim Reprod.* 2004a; 1:31-44.
- Ginther O.J. & Utt M.D. 2004b. Doppler Ultrasound in Equine Reproduction: Principles, Techniques, and Potential. *Journal of Equine Veterinary Science.* 24: 516-526.
- Ginther OJ., Beg MA., Gastal MO., Gastal EL. Follicle dynamics and selection in mares. *Anim Reprod.* 2004c; 1:45-63.
- Ginther OJ., Utt MD., Bergfelt DR., Beg MA. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. *Animal Reproduction Science.* 2006; 95:144-150.
- Ginther O.J., Gastal E.L., Gastal M.O., Beg M.A. Conversion of a viable preovulatory follicle into a hemorrhagic anovulatory follicle in mares. *Animal Reproduction Science.* 2006b; 3: 29-40.
- Ginther O.J.. *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography*, Ginther O.J. (ed). Cross Plains: Equiservices Publishing 2007;258p.

- Ginther O.J., Gastal E.L., Gastal M.O., Utt M.D. & Beg M.A.. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Animal Reproduction Science* 2007; 99(1-2): 213-220.
- Ginther O.J., Gastal E.L., Gastal M.O., Beg M.A. Effect of prostaglandin F 2 alfa on ovarian, adrenal and pituitary hormones and on luteal blood flow in mares. *Domest. Anim. Endocrinol* 2007b. 32: 315-328.
- Ginther O.J., Gastal E.L., Gastal M.O., Beg M.A. Intrafollicular effect of IGF1 on development of follicle dominance in mares. *Animal Reproduction Science*. 2008; 105: 417-423.
- Ginther O.J., Rodrigues B.L., Ferreira J.C., Araujo R.R. & Beg M.A. Characterization of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF2alpha (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. *Reproduction, Fertility and Development* 2008b. 20(6): 684-693.
- Ginther O.J., Gastal E.L., Gastal M.O., Jacob JC, Beg M.A. induction of haemorrhagic anovulatory follicles in mares. *Reproduction, Fertility and Development* 2008c. 20:947-954.
- Goudet G., Belin F., Bezard J. Gerard N. Intrafollicular content of luteinizing hormone receptor, alpha-inhibin, and aromatase in relation to follicular growth, estrous cycle stage, and oocyte competence for in vitro maturation in the mare. *Biol. Reprod.* 1999; 60:1120-1127.
- Greenaway J, Connor k, Pedersen H, Coomber B, Lamarre J, Petrik J. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology* 2004;145:2896-2905.
- Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*. 1997; 277: 48–50.
- Hedin L, Gaddy-Kurten D, Kurten R, DeWitt DL, Smith WL, Richards JS. Prostaglandin endoperoxide synthase in rat ovarian follicles: content, cellular distribution, and evidence for hormonal induction preceding ovulation. *Endocrinol* 1987;121:722–31.
- Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Rev. Cytol.* 1991; 124: 43- 101.

Hodges JK, Green DI, Cottingham PG, Sauer MJ, Edwards C, Lightman SL. Induction of luteal regression in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) by a gonadotropine-releasing hormone antagonist and the effects on subsequent follicular development. *J Reprod Fertil*, 1988; 82: 743-752.

Huirne JA, Lambalk CB. Gonadotropin-releasing-hormone-receptor antagonists. *Lancet*. 2001; 358: 1793-803.

Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update* 2005;11:162-178.

Irvine CHG. Kinetics of gonadotrophins in the mare. *J Reprod Fertil*, 1979; 27 (Suppl):131-141.

Irvine CH, Alexander SL. Secretory patterns and rates of gonadotropine-releasing hormone, follicle-stimulating hormone, and luteinizing hormone revealed by intensive sampling of pituitary venous blood in the luteal phase mare. *Endocrinol*, 1993; 132: 212-218.

Irvine CH., Alexander A., McKinnon AO. Reproductive hormone profiles in mares during the autumn transition as determined by collection of jugular blood at 5 h intervals throughout ovulatory cycles. *J Reprod Fertil*. 2000; 118 (1):101-109.

Jia H, Jezequel S, Lohr M, Shaikh S, Davis D, Soker S, Selwood D, Zachary I, Peptides encoded by exon 6 of VEGF inhibit endothelial cell biological responses and angiogenesis induced by VEGF, *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 164-173.

Joussen AM, Kirchhof B, Gottstein C. Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese – Möglichkeiten antiangiogener Therapie. *Der Ophthalmologe: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*. 2003; 100: 284–291

Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* 2002;82:673-700.

Kraus S, Naor Z, Seger R. Intracellular signaling pathways mediated by the Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) receptor. *Arch Medical Res*. 2001; 32: 499- 509.

Levy AP, Levy N S, Wegner S, Goldberg M.A. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem*. 1995; 270: 13333–13340.

Liu YX, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells—identification of a 5' enhancer. *Circ. Res.* 1995; 77: 638–643.

Martelli A, Berardinelli P, Russo V, Mauro A, Bernabò N, Gioia L, Mattioli M, Barboni B. Spatio-temporal analysis of vascular endothelial growth factor expression and blood vessel remodeling in pig ovarian follicles during the periovulatory period. *J Mol Endocrinol* 2006; 36:107-119.

Mihm M., Austin EJ., Good TE., Ireland JL., Knight P.G., Roche JF. Ireland JJ. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biol. Reprod.* 2000; 63:811-819.

McClure NM, MacPherson AM, Abberton KM, Healy DL, Rogers PAW. Human follicular fluid maturity and endothelial cells. *Hum Reprod* 1993; 8: 1564-1569.

Monget P., Monniaux D. Growth factors and the control of folliculogenesis. *J. Reprod. Fertil.* 1995; 49:321-333.

Murphy BD, Martinuk SD. Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine .Rev.* 1991; 12:27-44

Neill JD, Duck LW, Sellers JC, Musgrove LC. A gonadotropin - releasing hormone (GnRH) receptor specific for GnRH II in primates. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 282:1012-8.

Neill JD. Mammalian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor subtypes. *Arch Physiol Biochem.* 2002; 110: 129-36.

Neill JD. GnRH and GnRH receptor genes in the human genome. *Endocrinology* 2002b; 143:737-43.

Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 2000;80:1-29.

Petrova TV, Makinen T, Alitalo K. Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res* 1999;253:117-130.

Priddy AR, Killick SR. Eicosanoids and ovulation prostaglandins leukotrienes essential fatty acids. 1993;49:827-31.

Quirk MS, Cowan GR, Harman MR, Hu LC, Porter AD. Ovarian follicular growth and Atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci* 2004;82(E Suppl):E40-E52.

Redmer DA, Doraiswamy V, Bortnem BJ, Fisher K, Jablonka-Shariff A, Grazul-Bilska AT, Reynolds LP. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol Reprod* 2001;65:879-889.

Reynolds LP., Redmer DA. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J. Anim. Sci.*1998; 76:1671-1681.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386:671-674.

Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001;114:853-865.

Rosado A, Rosales AM. Maduración folicular en el mamífero. Atresia, determinantes bioquímicos. *Ciencia* 1991;42:81-97.

Russell DL, Robker RL. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update* 2007;13:289-312.

Robker RL, Russell DL, Yoshioka S, Sharma SC, Lyndon JP, O'Malley BW, Espey LL, Richards JS. Ovulation: a multi-gene, multistep process. *Steroids* 2000; 65:559-70.

Saint-Dizier M, Foulon-Gauze F, Lecompte F, Combarous Y, Chopineau M. Cloning and functional expression of the equine luteinizing hormone/chorionic gonadotrophin receptor. *J Endocrinol* 2004;183:551-9.

Sallinen H, Anttila M, Narvainen J, Koponen J, Hamalainen K, Kholova I, Heikura T, *et al.* Antiangiogenic gene therapy with soluble VEGFR-1, -2, and -3 reduces the growth of solid human ovarian carcinoma in mice. *Mol Ther* 2009;17:278-284.

Siddiqui M.A., Ferreira J.C., Gastal E.L., Beg, M.A., Cooper D.A. & Ginther O.J. Temporal relationships of the LH surge and ovulation to echotexture and power Doppler signals of blood flow in the wall of the preovulatory follicle in heifers. *Reproduction, Fertility and Development* 2010. 22 (7): 1110-1117.

Seibel MM, Smith D, Dlugi AM, Levesque L. Periovulatory follicular fluid hormone levels in spontaneous human cycles. *J Clin EndocrinolMetab* 1989; 68: 1073-1077.

- Senger P.L. Pathways to Pregnancy and Parturition. Second Edition. Current Conceptions. 2003 : 183-214.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature (London). 1992; 359: 843–845.
- Sirois J, Dore M. The late induction of prostaglandin G/H synthase-2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process. Endocrinology 1997; 138:4427-4434.
- Spicer LJ., Echternkamp SE. The ovarian insulin and insulinlike growth factor system with an emphasis on domestic animals. Domest. Anim. Endocrinol. 1995; 12:223-245.
- Spicer LJ. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: A control mechanism for selection of dominant follicles. Biol. Reprod. 2004; 70:1223-1230.
- Stangroom J. E., Weevers R. G., Anticoagulating activity of equine follicular fluid. J Reprod Fertil. 1962; 3: 269-282.
- Tamanini C, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. Reprod Domest Anim 2004;39:206-216.
- Tsafiriri A, Chun SY. Ovulation. En: Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology. Vol. 1 Adhasi EY, Rock JA, Rosenwaks Z editors. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1996
- Ulloa-guirre A, A, Timossi C, Mendez JP. Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? I. Gonadotrophins are synthesized and released in multiple molecular forms. A matter of fact. Hum Reprod 2001;16:599–604.
- Vanderwall DK, Silvia WJ, Fitzgerald BP. Concentrations of oxytocin in the intercavernous sinus of mares during luteolysis: temporal relationship with concentrations of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 alpha. J Reprod Fertil. 1998; 112(2):337-46.
- Vernon MW, Strauss S, Simonelli M, Zavy MT, Sharp DC. Specific pgf-2 alpha binding by the corpus luteum of the pregnant and non-pregnant mare. J. Reprod. Fertil. 1979; 421-429.

Wang L, Bogerd J, Choi HS, Seong JY, Soh JM, Chun SY, Blumenrohr M, Troskie BE, Millar RP, Yu WH, McCann SM, Kwon HB. Three distinct types of GnRH receptor characterized in the bullfrog. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 361-6.

Watson ED, Pedersen HG, Thomson SRM, Fraser HM. Control of follicular development and luteal function in the mare: effects of a GnRH antagonist. *Theriogenology*. 2000; 54:599-609.

Watson ED, Al-zi'abi MO. Characterization of morphology and angiogenesis in follicles of mares during spring transition and the breeding season. *Reproduction*. 2002; 124: 227–234.

Watson E.D., Bae S.-E., Al-zi'abi, Hogg C.O., Armstrong D.G. Expresión of mRNA encoding insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) during induced and natural regression of equine corpora lutea. *Theriogenology*. 2005

Westergaard L, Christensen IJ, McNatty KP. Steroid levels in ovarian follicular fluid related to follicle size and health status during the normal menstrual cycle in women. *Hum Reprod* 1986; 1:227-232.

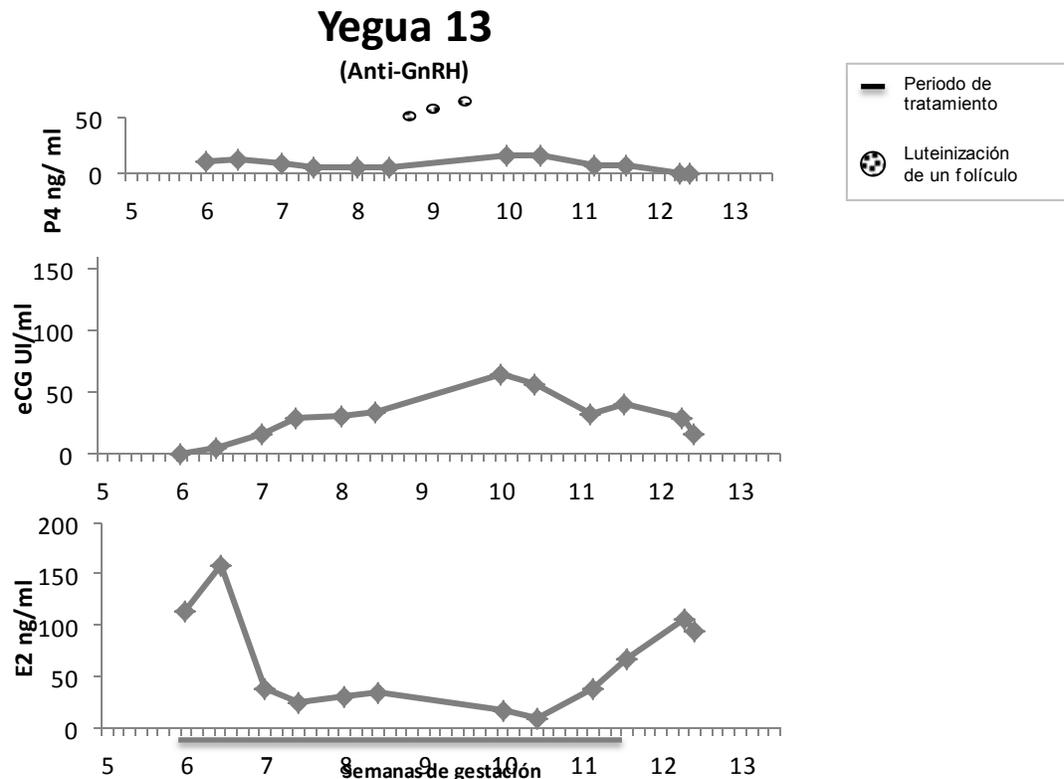
Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) peceptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem* 2001;276:26969-26979.

## X. ANEXO

### A. CONCENTRACIÓN HORMONAL EN UNA YEGUA TRATADA CON UN ANTAGONISTA DE GNRH QUE PRESENTÓ MÚLTIPLES LUTEINIZACIONES DURANTE EL PERIODO DE EXPERIMENTAL

La “Yegua 13” formó parte del grupo AG sin embargo, no se pudo realizar la aspiración folicular ya que los folículos alcanzaron un diámetro máximo de tan solo 34 mm de diámetro y a la ultrasonografía no mostraron alteraciones en el líquido folicular de modo que únicamente se observó su repentina luteinización.

En esta yegua así como en el resto de los animales de los grupos experimentales, se suprimió la ovulación secundaria y se formaron las glándulas lúteas accesorias desde de la semana 8 de gestación. En la figura 18 se observan las tres luteinizaciones que se presentaron durante las semanas 8 y 9 de gestación.



**Figura 18** Concentración de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina.

## B. CONCENTRACIÓN HORMONAL EN YEGUAS CON ANTAGONISTA DE GNRH QUE NO FORMARON FOLÍCULOS ANOVULATORIOS HEMORRÁGICOS

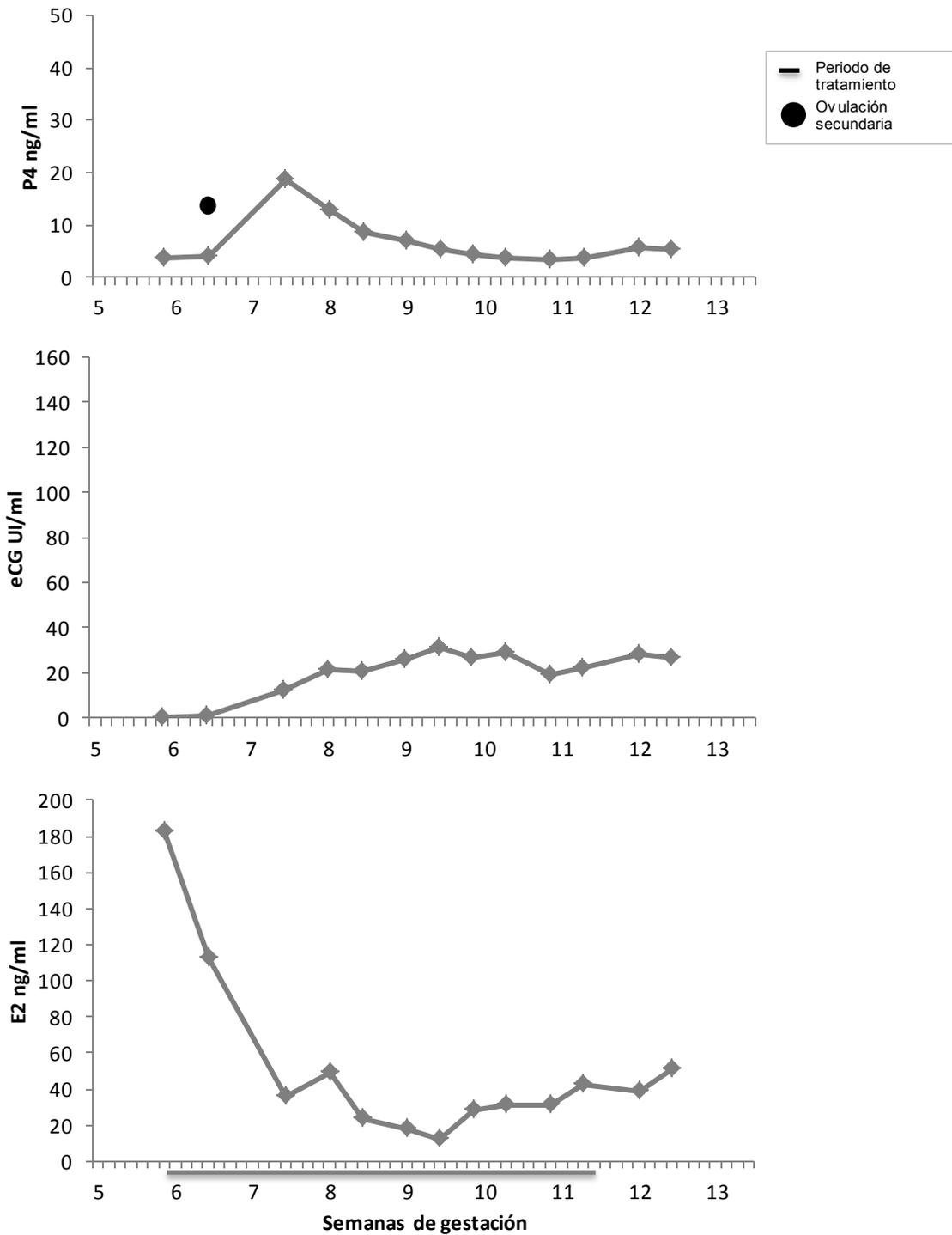
Las yeguas “Lady Xoc”, “Valentina”, “Lady D” y “Candela” pertenecieron al grupo AG sin embargo, no fueron incluidas con las demás debido a que ninguna formó folículos anovulatorios hemorrágicos a pesar de que la concentración máxima de eCG que alcanzaron estuvo entre 23 y 45 UI/ml con niveles de progesterona 10 ng/ml y de 12 a 132 ng/ml para el estradiol (figuras 19.1 a 19.4).

En el caso de la yegua “Lady Xoc” (Figura 19.1) se puede observar que hubo una ovulación secundaria durante la semana 6 de gestación, tal ovulación correspondió a un folículo cuyo diámetro, al inicio del tratamiento con el antagonista de GnRH, era de 50 mm de diámetro.

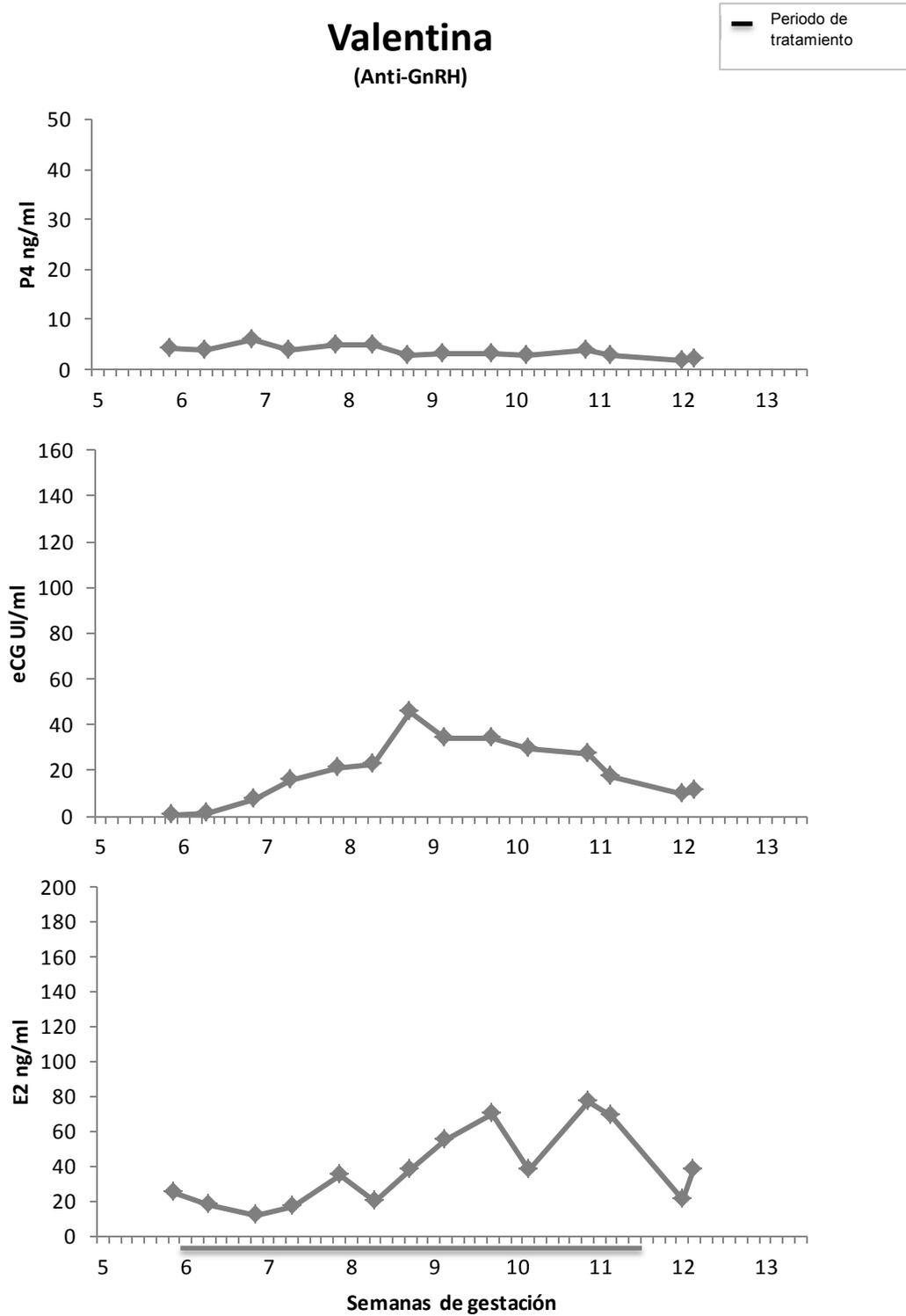
Las yeguas “Valentina” y “Candela” (Figura 19.2 y 19.3) mantuvieron la gestación únicamente con el cuerpo lúteo primario pero, la yegua “Candela” tuvo el doble de concentración de progesterona que la yegua “Valentina”.

En la semana 7 y 9 de gestación, en la yegua “Lady D” (Figura 19.4), se observó un folículo con puntillado ecogénico en el antro no obstante, fue la única alteración que presentó para finalmente sufrir regresión.

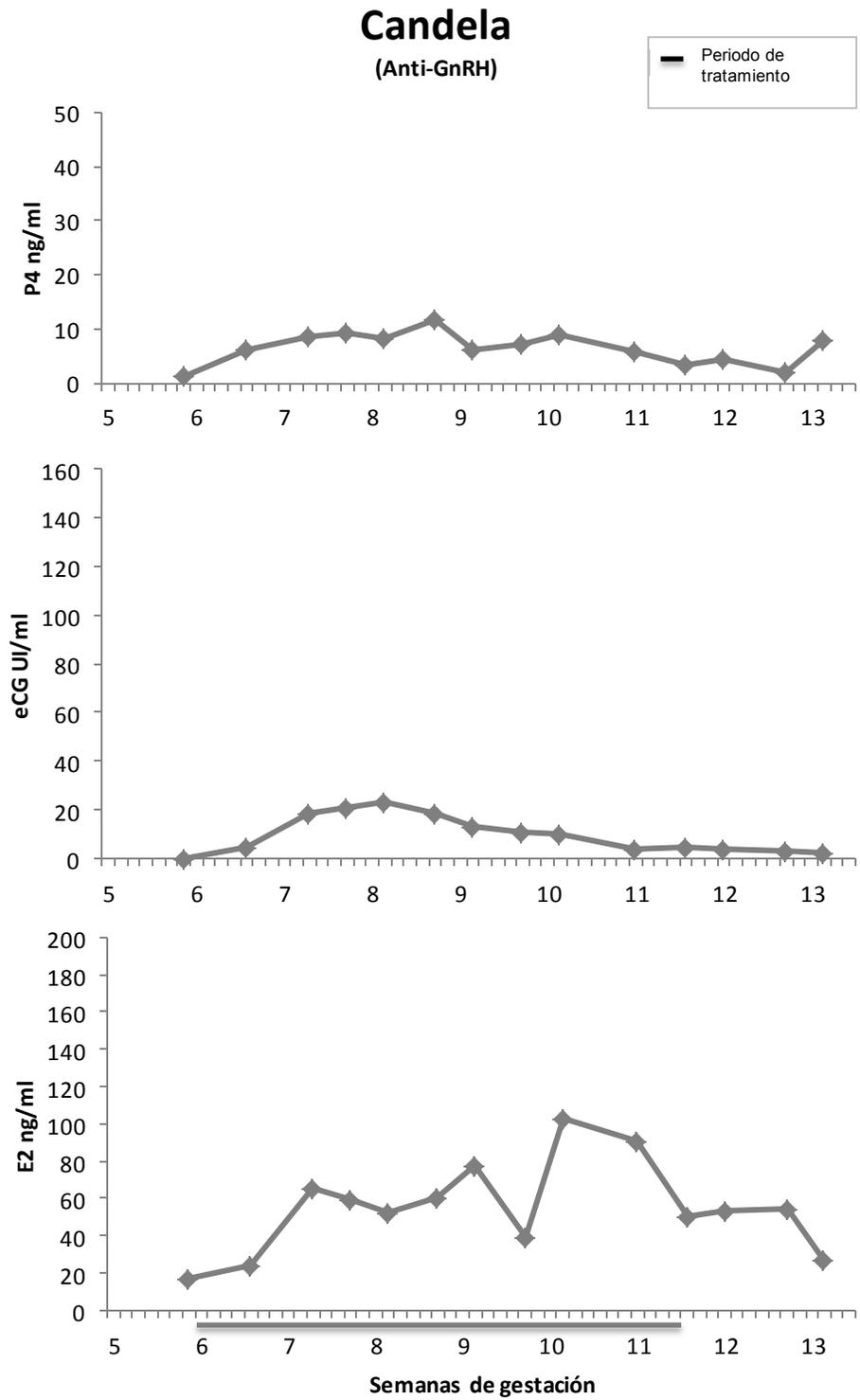
## LadyXoc (Anti-GnRH)



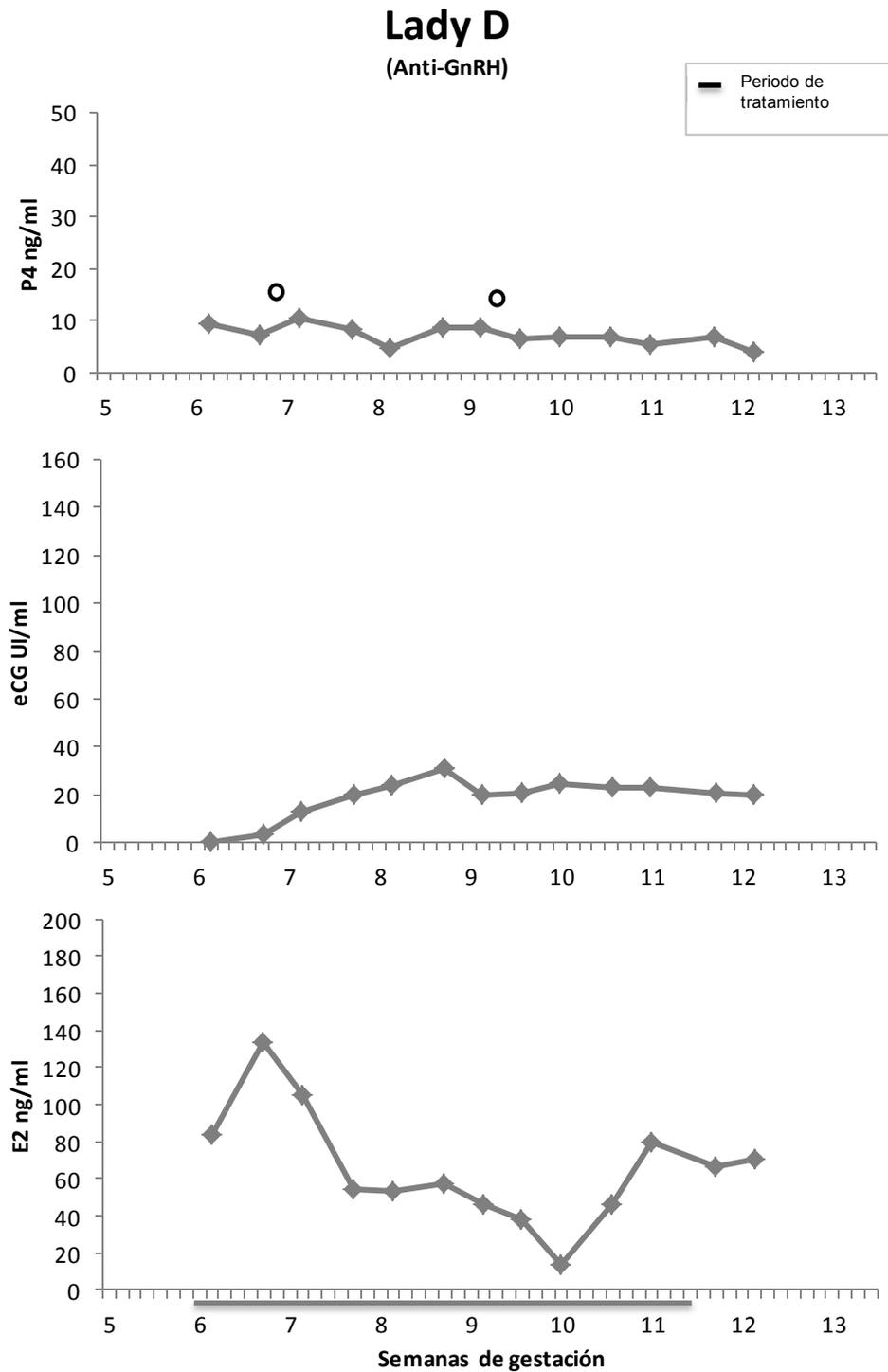
**Figura 19.1** Concentración de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina del grupo AG.



**Figura 19.2** Concentración de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina del grupo AG.



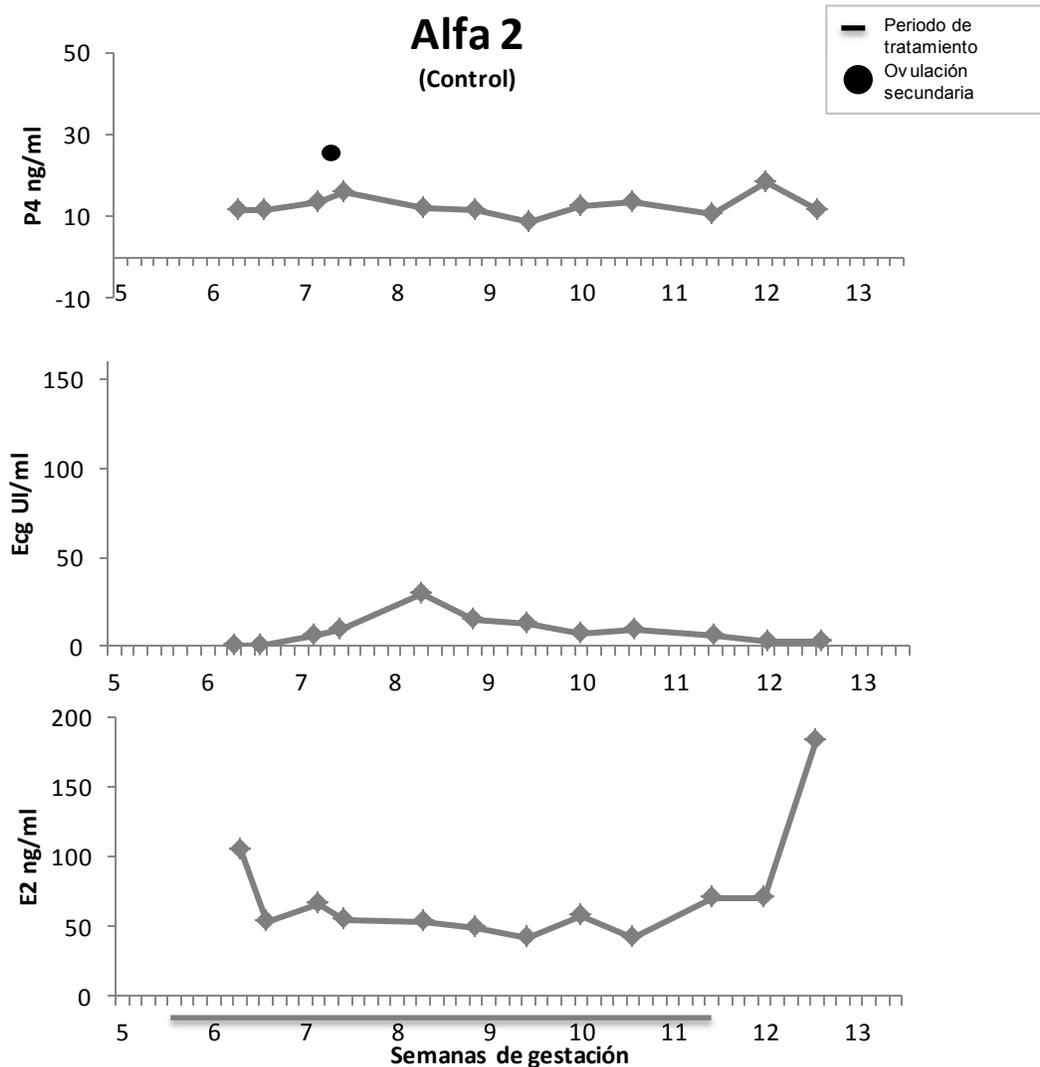
**Figura 19.3** Concentración de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina del grupo AG.



**Figura 19.4** Concentración de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina del grupo AG. El círculo hueco indica el momento en que se observó cambios en los folículos.

### C. CONCENTRACIÓN HORMONAL EN UNA YEGUA DEL GRUPO CONTROL QUE NO FORMÓ CUERPOS LÚTEOS ACCESORIOS

La yegua “Alfa” (Figura 20) no recibió ningún tratamiento hormonal sin embargo no formó cuerpos lúteos accesorios a pesar de que alcanzó niveles de eCG con concentraciones similares a otras yeguas del estudio, incluyendo las de los grupos experimentales que formaron FAHs. De tal manera esta yegua “Alfa” mantuvo la gestación únicamente con el cuerpo lúteo primario y el cuerpo lúteo secundario.



**Figura 20** Concentración de progesterona, eCG y estradiol en una yegua con gestación equina que formó solo un cuerpo lúteo suplementario.