



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EFFECTO DE LA ÉPOCA DEL AÑO SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LAS COPAS
ENDOMETRIALES Y LA SECRECIÓN DE eCG EN YEGUAS UTILIZADAS PARA
LA PRODUCCIÓN DE MULAS**

**T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA
EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

ANA MYRIAM BOETA ACOSTA

TUTOR

PhD. LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO

COMITÉ TUTORAL:

PhD. DAN SHARP

DR. JAVIER VALENCIA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

D E D I C A T O R I A S

A Lucio

Ti ringrazio per il grande amore che mi hai saputo dare e per i bellissimi momenti che insieme abbiamo vissuto spero tanto di averti accanto a me per tutto il resto della mia vita.

Con tanto amore

A Cate

Principessa sei il regalo piu bello che Dio mi ha dato, grazie per esistere. Grazie per darmi i tuoi sorrisi, grazie per insegnarmi tante cose, ho capito che anche i figli possono insegnare tante cose ai genitori.

Je T'ame beaucoup

A mi mama, abue, Rose y Karla

Se que no han sido tiempos fáciles, pero a pesar de todo nos hemos mantenido unidas y fuertes gracias al amor que existe entre nosotras.

Las quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, institución educativa a la cual le debo toda mi formación educativa desde mi bachillerato hasta mi doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero que me brindo durante la realización de mis estudios.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN 236602

A Luis Zarco, quien me ha guiado desde el inicio de mi carrera profesional y me ha brindado todo su apoyo y confianza durante estos años.

A todos los miembros de mi Comité tutorial y en especial al Dr. Dan Sharp, quien contribuyo de manera especial en el desarrollo de la investigación.

A la valiosa colaboración de Clara Murcia, Lucia Porta, Susana Rojas y Ana Rodriguez quien fueron las responsables de llevar a cabo las mediciones hormonales de esta investigación.

A la Donkey Association de México y en especial a Mariano Hernández por todo el apoyo que me brindo, durante la investigación.

Al Dr. Carlos Gutiérrez por su ayuda brindada con las pruebas estadísticas.

Al Departamento de Equinos y en especial al Dr. Rodriguez Monterde y la Dra. Maria Masri por la ayuda desinteresada durante el trabajo.

A la MVZ. Heidi Sosaya y al laboratorio INTERVET por todos los productos hormonales que nos donaron para la realización del trabajo de campo.

A todas aquellas personas que participaron en mayor o menor grado durante todos estos 4 largos años de duras batallas, especialmente a Francisco Velásquez, Erick Boyzo, Stephanie Retteg, Guillermo Gonzáles, Elías Velásquez, Christian Urias, Gabriela Boneta, Yair, Celia Pedro, Chava y De la Rosa.

C O N T E N I D O

1. RESUMEN.....	4
2. ABSTRACT.....	6
3. INTRODUCCIÓN.....	8
3.1 Objetivos.....	11
3.2 Hipótesis.....	11
4. REVISIÓN DE LITERATURA	
4.1 ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA.....	12
4.1.1 Neuroendocrinología de la Estacionalidad.....	14
4.1.2 Época ovulatoria.....	18
4.1.3 Época anovulatoria.....	19
4.1.4 Época de Transición.....	20
4.1.5 Estacionalidad de la foliculogénesis y la función lútea durante la gestación.....	21
4.2 PÉRDIDA DE LA GESTACIÓN	
4.2.1 Muerte embrionaria temprana.....	23
4.2.2 Muerte embrionaria tardía y muerte fetal.....	27
4.3 GONADOTROPINA CORIÓICA EQUINA (eCG).....	27
4.3.1 Formación y Destrucción de las Copas Endometriales.....	28
4.3.2 Clasificación y Estructura Bioquímica de la eCG.....	33
4.3.3 Propiedades Biológicas de la eCG.....	35
4.3.4 Regulación de la Secreción de eCG.....	39
4.3.5 Papel de la eCG Durante la Gestación Equina.....	40
4.4 PLACENTACIÓN EQUINA.....	44

4.5 MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LA FALLA DE LA GESTACIÓN EQUINA	
4.5.1 Xenogestación.....	46
4.5.2 Gestación Mular.....	48
4.6 MÉTODOS PARA EVALUAR LAS CAUSAS DE PÉRDIDA DE LA GESTACIÓN.....	50
4.6.1 Determinación de Progesterona.....	50
4.6.2 Determinación de Estrógenos.....	51
4.6.3 Seguimiento Ultrasonográfico.....	54
5. OVARIAN ACTIVITY OF THE MARE DURING WINTER AND SPRING AT A LATITUDE OF 19° 21' NORTH.....	56
6. PROGESTERONE AND EQUINE CHORIONIC GONADOTROPIN CONCENTRACIONES AROUND THE TIME OF PREGNANCY LOSS IN MARES IMPREGNATED BY DONKEYS OR STALLION.....	60
7.1 MATERIAL Y MÉTODOS.....	68
7.2 RESULTADOS	
7.2.1 Concentraciones hormonales durante gestaciones normales.....	71
7.2.2. Formación de cuerpos lúteos accesorios.....	74
7.2.3. Relación entre el número de cuerpos lúteos y las concentraciones hormonales.....	76
7.2.4 Relación entre concentraciones de eCG y concentraciones de progesterona.....	78
7.2.5. Mortalidad embrionaria y fetal.....	79
7.2.6 Descripción de los casos de aborto en yeguas servidas con burro.....	81

7.2.6.1 <u>Yegua con deficiencia lútea primaria que abortó un embrión mula</u>	82
7.2.6.2 <u>Yeguas con deficiencia lútea asociada con baja producción de eCG y que abortaron embriones mula</u>	84
7.2.6.3 <u>Yeguas con luteólisis activa que abortaron embriones mula</u>	88
7.2.6.4 <u>Yegua con combinación de deficiencia lútea primaria y luteólisis activa que abortó un embrión mula</u>	91
7.2.6.5 <u>Yeguas con patología traumático-infecciosa que abortaron embriones mula</u>	92
7.2.7. Descripción del caso de aborto en una yegua servida con caballo	95
7.2.8 Descripción de gestaciones normales con concentraciones bajas de progesterona y eCG	97
7.2.9 Descripción de un caso con dos ovulaciones accesorias en ausencia total de eCG	103
7.2.10 Descripción del único caso de gestación con embrión mula en el que se formaron 3 cuerpos lúteos accesorios	103
7.3 DISCUSIÓN	
7.3.1 Perfiles hormonales y formación de cuerpos lúteos accesorios en gestaciones normales	106
7.3.1.1 <u>Efecto de la época del año</u>	106
7.3.1.2 <u>Diferencias en las concentraciones hormonales y formación de cuerpos lúteos accesorios en yeguas servidas con burro y yeguas servidas con caballo con gestaciones normales</u>	108
7.3.1.3 <u>Relación entre eCG, progesterona y formación de cuerpos lúteos accesorios</u>	109

7.3.2 Mortalidad embrionaria y fetal.....	112
7.3.2.1 <u>Efecto de la época del año.....</u>	112
7.3.2.2 <u>Diferencias en mortalidad embrionaria y fetal entre yeguas servidas con caballo y yeguas servidas con burro.....</u>	113
7.3.2.3 <u>Análisis de las causas de mortalidad fetal.....</u>	115
7.4 CONCLUSIONES.....	120
7.5 ANEXO – PERFILES HORMONALES DE LAS YEGUAS NO INCLUIDAS EN EL CUERPO DEL CAPÍTULO VII.....	121
7.6 LITERATURA CITADA.....	155

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.1 Imágenes ultrasonográficas de vesículas embrionarias normales de 12 y 21 días de gestación.....	24
Figura 4.2 Imágenes ultrasonográficas de vesículas embrionarias de 25 y 30 días de gestación que sufrieron mortalidad embrionaria.....	25
Figura 4.3 Úteros de yeguas con gestaciones mulares de 65 días de edad y el escaso desarrollo de las copas endometriales.....	48
Figura 4.4 Imágenes ultrasonográficas de hallazgos de muerte fetal.....	55
Figura 7.1 Concentraciones de progesterona en gestaciones normales de yeguas servidas con burro o yeguas servidas con caballo.....	72
Figura 7.2 Concentraciones de eCG en gestaciones normales de yeguas servidas con burro o yeguas servidas con caballo.....	73
Figura 7.3 Concentraciones de sulfato de estrona en gestaciones normales de yeguas servidas con burro o yeguas servidas con caballo.....	73
Figura 7.4 Número de cuerpos lúteos acumulados en gestaciones normales en yeguas servidas con burro y yeguas servidas con caballo.....	74
Figura 7.5 Clasificación de las yeguas de acuerdo al número total de cuerpos lúteos acumulados durante la gestación.....	75
Figura 7.6 Concentraciones de progesterona y eCG en yeguas servidas con caballo que a lo largo de la gestación acumularon 2, 3 o 4 cuerpos lúteos.....	76
Figura 7.6 bis Concentraciones de progesterona y eCG en yeguas servidas con burro que a lo largo de la gestación acumularon 2, 3 o 4 cuerpos lúteos.....	77
Figura 7.7 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión mula que sufrió aborto por una deficiencia lútea primaria.....	83

Figura 7.8 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión mula que sufrió aborto por deficiencia lútea asociada a ausencia de secreción de eCG.....	85
Figura 7.9 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión mula que sufrió aborto por deficiencia lútea asociada a deficiente secreción de eCG.....	86
Figura 7.10 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión mula que sufrió aborto por deficiencia lútea asociada a una producción deficiente de eCG.....	87
Figura 7.11 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en diferentes semanas de la gestación en una yegua con embrión mula que sufrió aborto por una lúteolisis activa.....	89
Figura 7.12 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en diferentes semanas de la gestación en una yegua con embrión mula que sufrió aborto por regresión del cuerpo lúteo.....	90
Figura 7.13 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión mula que sufrió aborto después de una deficiencia lútea primaria seguida por lúteolisis repentina.....	91
Figura 7.14 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión mula que sufrió muerte fetal sin presentar deficiencia de en la secreción de eCG.....	93
Figura 7.15 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión mula que sufrió muerte fetal por deficiencia lútea asociada con ausencia en la producción de eCG.....	94
Figura 7.16 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión equino que sufrió aborto por insuficiencia lútea primaria e hipofunción placentaria.....	96
Figura 7.17 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con gestación exitosa de embrión equino con concentraciones reducidas de progesterona y eCG.....	98
Figura 7.18 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con gestación exitosa de embrión equino con concentraciones reducidas de progesterona y eCG.....	99
Figura 7.19 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión mula que presentó una gestación normal con bajas concentraciones de progesterona y eCG.....	101

Figura 7.20 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión mula que presentó una gestación normal con niveles bajos de progesterona y eCG.....	102
Figura 7.21 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua gestante con embrión mula que formó dos cuerpos lúteos accesorios y niveles basales de eCG.....	104
Figura 7.22 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en la única yegua gestante con embrión mula que formó tres cuerpos lúteos accesorios.....	105
7.5.1 Yeguas servidas con burro que tuvieron gestación normal y concentraciones normales o elevadas de progesterona y eCG.....	121
7.5.2 Yeguas servidas con burro que tuvieron gestación normal y concentraciones bajas de progesterona a partir de la semana 10.....	131
7.5.3 Yeguas servidas con burro que tuvieron gestación normal y concentraciones excesivamente bajas de eCG.....	136
7.5.4 Yeguas servidas con caballo que tuvieron gestación normal.....	138

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 7.1 Incidencia de mortalidad embrionaria en yeguas gestantes con embrión equino o mula en gestaciones que comenzaron en el mes de junio o abril.....	79
Cuadro 7.2. Incidencia de abortos en yeguas gestantes con embrión equino o con mula en gestaciones que comenzaron en el mes de junio o abril.....	80
Cuadro 7.3. Incidencia total de pérdida de gestación en yeguas gestantes con embrión equino o mula en gestaciones que comenzaron en el mes de junio o abril.....	81
Cuadro 7.4 Clasificación de las yeguas servidas con burro que abortaron de acuerdo a la causa aparente del aborto.....	82

1. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue comparar la incidencia de muerte fetal por disfunción lútea debida a la regresión prematura de copas endometriales en yeguas inseminadas con semen de burro o con semen de caballo al inicio o al final de la época ovulatoria. Además a través del seguimiento ultrasonográfico y hormonal (eCG, progesterona y sulfato de estrona) se determinaron las causas probables de la muerte del producto. Antes de iniciar el experimento propiamente dicho se realizó una investigación para delimitar la época ovulatoria de la yegua criolla en México. A partir de los resultados de dicho estudio se programaron los experimentos en época reproductiva plena y en época de transición hacia la estación no reproductiva. Así, la primera parte del experimento se realizó al inicio de la época ovulatoria y se utilizaron 24 yeguas gestantes; 14 inseminadas con burro y 10 inseminadas con caballo. Se realizaron 2 veces por semana evaluaciones ultrasonograficas hasta el día 120 de la gestación. En cada ocasión se determinó el número de cuerpos lúteos presentes en los ovarios así como la viabilidad fetal (presencia de latido cardiaco, movimiento fetal y/o pulsación del cordón umbilical). Además, a partir de la quinta semana de gestación se obtuvieron dos veces por semana muestras sanguíneas para la determinación de progesterona, a partir de la sexta semana para la determinación de eCG y a partir de la semana 9 para la determinación de sulfato de estrona con el objeto de evaluar respectivamente la función de los cuerpos luteos, las copas endometriales y la viabilidad fetal. La segunda parte del experimento se realizó al final de la época ovulatoria, utilizando 30 yeguas, 18 inseminadas con burro y 12 inseminadas con caballo, realizando el mismo seguimiento ultrasonográfico y hormonal descrito para las yeguas de la primera parte del estudio. En este trabajo no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre la incidencia de pérdida de gestación ocurrida al inicio o al final de la época ovulatoria. Tampoco existieron diferencias significativas entre épocas con respecto a las concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona. En contraste, si se identificó un efecto del tipo de gestación (con caballo o con burro), ya que los abortos presentados en el grupo de yeguas servidas con burro fueron

significativamente mayores ($P < 0.05$) que los que se presentaron en yeguas servidas con caballo. También se confirmó que las concentraciones de progesterona y eCG en yeguas servidas con burro son significativamente menores ($P < 0.05$) que las yeguas servidas con caballo. Se demostró que en yeguas servidas con burro sí se pueden formar cuerpos lúteos accesorios pesar de la deficiente secreción de eCG. No obstante en yeguas servidas con caballo los cuerpos lúteos accesorios se presentaron más temprano durante la gestación y en mayor número que en yeguas servidas con burro. En total se presentaron 9 abortos en yeguas servidas con burro y 1 en yeguas servidas con caballo. Casi la mitad de las pérdidas gestacionales estuvieron asociadas con deficiencia en la secreción de eCG y progesterona (3 fetos mula y 1 feto caballo), mientras que la mayoría de los restantes se debió a lúteolisis activa, posiblemente por liberación endógena de $PGF2\alpha$ seguida por regresión del cuerpo lúteo y muerte fetal. Se concluye que en cualquier época del año las yeguas servidas con burro tienen una mayor incidencia de abortos que las yeguas servidas con caballo. Se confirmó que las concentraciones de progesterona y eCG circulantes en yeguas servidas con burro son significativamente menores que en las yeguas servidas con caballo, lo que aumenta el riesgo de sufrir aborto tanto por una insuficiencia lútea secundaria como por un mayor riesgo de sufrir luteolisis activa. Sin embargo, también se demostró que la presencia de concentraciones elevadas de eCG no siempre es indispensable ni para la formación de cuerpos lúteos accesorios ni para mantener concentraciones de progesterona compatibles con una gestación exitosa.

2. ABSTRACT

The objective of this study was to compare the incidence of pregnancy failure due to luteal dysfunction associated with premature endometrial cup regression in mares impregnated with donkey or horse semen at the beginning or the end of the ovulatory season. Also, the probable causes of fetal death were determined through serial ultrasonographic observations and hormonal determinations. Before starting the experiment a study was carried out to delimit the ovulatory season of criollo mares in Mexico. Thereafter, the experiment was planned in order to have mares impregnated either during the ovulatory season or during the transition towards the anovulatory season. Thus, the first part of the experiment was started at the beginning of the ovulatory season using 24 pregnant mares; 14 of which had been inseminated with donkey semen and 10 with horse semen. Ultrasonographic examinations were carried out twice a week from day 30 to 120 of pregnancy. Each time the number of corpora lutea present at the ovaries was registered and fetal viability was assessed (presence of heart beat, fetal movement and/or umbilical cord beat). Blood samples were collected twice a week starting on the 5th week of gestation for progesterone determinations, on the 6th week for eCG, and on the 9th week for estrone sulphate measurements, that were respectively used to evaluate luteal function, endometrial cup function and fetal viability. The second part of the experiment was carried out at the end of the ovulatory season using 30 mares; 18 impregnated with donkey semen and 12 impregnated with horse semen. Ultrasonographic and hormonal monitoring was carried out as in the first part. No significant differences ($p>0.05$) were found between seasons with respect to the incidence of pregnancy failure or in relation to the concentrations of progesterone, eCG or estrone sulphate. In contrast, significant effects of the type of gestation (with donkey or with horse) were found. The abortion incidence in the mares impregnated with donkey semen was significantly higher ($p<0.05$) than that found in the mares impregnated with horse semen. Also, it was confirmed that progesterone and eCG concentrations are significantly lower in mares carrying a mule fetus than in mares carrying an equine conceptus. It was demonstrated that mares carrying mule embryos can form accessory corpora lutea even though they

have low eCG production. However, mares impregnated with horses develop more accessories CL and they tend to do it earlier than mares impregnated by donkeys. A total of 9 abortions occurred on mares impregnated by donkeys and 1 in a mare impregnated by horse. Almost half of the pregnancy losses (3 mule fetuses and 1 equine fetus) were associated with deficient eCG and progesterone secretion, while most of the rest were due to active luteolysis, probably caused by endogenous PGF₂ α release followed by luteal regression and fetal death. It is concluded that at any time of the year the mares impregnated by donkeys have a higher incidence of pregnancy failure than mares impregnated by horses. It was confirmed that eCG and progesterone concentrations in mares carrying mule fetuses are lower than those present in mares with equine fetuses, and that this situation increases the risk of pregnancy failure due either to secondary luteal insufficiency or to active luteolysis. However, it was also demonstrated that the presence of high eCG concentrations is not always needed for the development of accessory CL to maintain the minimum progesterone concentrations needed for a successful pregnancy.

3. INTRODUCCIÓN

Debido a que la mula es un híbrido infértil, su producción requiere el cruzamiento entre *Equus caballus* (caballo doméstico) y *Equus asinus* (burro doméstico) (Allen et al., 1993). En la práctica este cruzamiento inter-especie se realiza mucho más frecuentemente entre yeguas y burros que entre caballos y burras. Existen datos que revelan que la cruce de yegua con burro resulta en una fertilidad relativamente baja, que no solo es debida a bajos porcentajes de concepción, sino también a una incrementada incidencia de abortos y mortinatos (Jordano et al., 1954).

Una posible causa de la baja fertilidad de yeguas servidas con burro es el rechazo prematuro que el sistema inmune de la hembra dirige en contra de las copas endometriales del embrión mula (Allen, 1982 Allen et al., 1973), que son las estructuras responsables de producir la hormona denominada gonadotropina coriónica equina (eCG) (Murphy y Martinuk, 1991). La eCG es responsable, junto con la FSH, de inducir la formación de cuerpos lúteos accesorios durante la gestación equina, así como de estimular la función tanto del cuerpo lúteo primario como de los accesorios (Allen, 2001b). La eCG es un importante regulador de la esteroidogénesis en el cuerpo lúteo de la yegua, por lo que a partir del día 40 hasta el 150 de la gestación los cuerpos lúteos producen cantidades adicionales de progestágenos (Daels, 1998). Sin embargo, no todas las yeguas gestantes desarrollan cuerpos lúteos secundarios, y en las que lo hacen hay gran variación tanto en el número como en el momento en que aparecen. Se ha demostrado que la gestación puede ser mantenida por varias semanas y aún continuar hasta su término sin la presencia de eCG y cuerpos lúteos secundarios (Allen, 2001a Allen y Stewart, 1993).

Los receptores lúteos para LH/eCG aumentan su afinidad después de que comienza la secreción de eCG, por lo que el cuerpo lúteo primario permanece receptivo a la eCG hasta que ocurra la transición de la fuente esteroidea lútea a la fuente esteroidea placentaria (Allen, 2001a).

En una gestación normal, resultado de la cruce de un caballo con una yegua, las copas endometriales producen altas concentraciones de eCG desde el día 35-40 hasta el día 120-150 de la gestación, cuando son rechazadas inmunológicamente

por la madre (Bergfelt et al., 1989). Durante todo este periodo la eCG estimula la función lútea. Después del día 100 la gestación ya no depende de la función lútea ni del efecto luteotrópico de la eCG, ya que en esa etapa la placenta produce suficientes progestágenos para mantener la gestación (Allen, 2001a).

Por otra parte, cuando una yegua es cruzada con burro con el objeto de producir una mula, las copas endometriales derivadas de las células coriónicas del embrión mula son rechazadas muy rápidamente, entre la séptima y decimoprimer semana, por lo que las concentraciones de eCG se reducen en forma muy prematura, y en ocasiones ni siquiera llegan a elevarse (Allen, 1982; Allen, 2001b). Esta falta de apoyo gonadotrópico provoca que se formen pocos cuerpos lúteos accesorios y que las concentraciones de progesterona se mantengan muy por debajo de las encontradas durante una gestación de yegua servida con caballo (Bergfelt et al., 1989; Allen et al., 1987; Allen, 2001b).

Los índices de fertilidad de las yeguas utilizadas para la producción de mulas son generalmente pobres (Jordano et al., 1954), por lo que hace algunos años postulamos la hipótesis de que la inadecuada función lútea derivada de la regresión prematura de las copas endometriales de las yeguas gestantes con un embrión mula podría ser la causa de una alta incidencia de mortalidad embrionaria durante la primera mitad de la gestación (Boeta y Zarco, 2005), encontrando que efectivamente, las bajas concentraciones de eCG y su pronto retorno a niveles basales en yeguas gestantes con un embrión mula, resultaron en una función lútea disminuida, produciéndose una incidencia de mortalidad embrionaria mayor a la obtenida en yeguas servidas con caballo. Sin embargo, en el estudio se encontró que un número elevado de yeguas servidas con burro llevaron su gestación a término en forma normal a pesar de que sus concentraciones de eCG siempre se mantuvieron muy reducidas, o incluso llegaron a permanecer basales a lo largo de la gestación (Boeta y Zarco 2005).

Estos resultados nos llevaron a preguntarnos cual es la verdadera función de la eCG, dado que evidentemente no es indispensable para mantener la gestación. Esta misma pregunta había sido formulada por Allen (2001b) quien encontró que la xenogestación obtenida al transferir embriones de burro a yeguas no siempre

resulta en la muerte del producto a pesar de que las copas endometriales nunca se desarrollan en éste tipo de gestación (Allen, 2001a; Allen, 2001b).

Es importante tomar en cuenta que la secuencia de aminoácidos de la eCG es idéntica a la de la LH equina (Bousfield et al., 1987). Aunque existen diferencias en la glicosilación de ambas hormonas, dichas diferencias solamente modifican variables tales como la potencia o la vida media de la hormona, pero no su efecto luteotrópico básico (Murphy y Martinuk, 1991). Por esta razón, se puede postular que la eCG producida por las copas endometriales tiene efectos redundantes con los de la LH, por lo que es posible pensar que la función de la eCG es la de servir como “seguro” para garantizar la correcta estimulación del cuerpo lúteo (Allen, 2001b; Bousfield et al., 1987). La progesterona producida por los cuerpos lúteos secundarios no es indispensable para el mantenimiento de la gestación, pero su presencia permite asegurar una fuente extra de progesterona en caso de una regresión prematura del cuerpo lúteo primario (Allen, 2001b).

Sin embargo, debe recordarse que la yegua es un animal con estacionalidad reproductiva, en la que la secreción hipofisiaria de LH sufre una fuerte inhibición durante la época no reproductiva (Sherman et al., 1992). Normalmente la mayoría de las yeguas quedan gestantes al inicio de la estación reproductiva, por lo que los primeros 120 días de su gestación transcurren durante la época reproductiva plena, cuando la secreción de LH hipofisiaria podría ser suficiente para mantener la función lútea sin necesidad de recurrir a la eCG. En cambio, si por cualquier razón la yegua queda gestante hacia el final de la época reproductiva, la primera parte de la gestación transcurrirá durante la época de inactividad ovárica, cuando las concentraciones de LH se encuentren fuertemente inhibidas.

Es posible que sea precisamente en éstos casos cuando la eCG tenga un papel más importante, ya que su producción y secreción son autónomas y no están sujetas a un control estacional. Así, la eCG podría haber evolucionado con el objeto de sustituir a la LH hipofisiaria cuando la concepción se produce hacia el final de la época reproductiva, o bien para mantener los niveles de P4 en caso de existir factores externos o internos que pongan en peligro la integridad del cuerpo lúteo.

La yegua gestante con un embrión híbrido es el modelo ideal para estudiar esta hipótesis, ya que es un animal con deficiencia de eCG en el que se podría evaluar la importancia de la eCG para mantener la gestación en yeguas que quedan gestantes a finales de la época reproductiva natural.

3.1 OBJETIVOS

- 1.- Determinar la incidencia de muerte fetal por regresión prematura de copas endometriales en yeguas inseminadas con semen de burro al final de la época reproductiva, comparándola con la obtenida en yeguas servidas con burro al inicio de la época reproductiva y la conseguida en yeguas servidas con caballo en ambas épocas del año.
- 2.- Determinar la incidencia de regresión prematura de las copas endometriales en cada tipo de gestación (con burro o caballo) y época del año.
- 3.- Determinar la incidencia de disfunción lútea debida a la ausencia de eCG en cada tipo de gestación y época del año.
- 4.- A través del estudio individual de las relaciones temporales entre concentraciones de progesterona, eCG, sulfato de estrona y pérdida de viabilidad fetal (muerte embrionaria o fetal), determinar la incidencia de muerte fetal atribuible a la regresión prematura de las copas endometriales en cada tipo de gestación y época del año.
- 5.- Determinar la incidencia de cuerpos lúteos y el día de su aparición en cada tipo de gestación y época del año.

3.2 HIPÓTESIS

La regresión prematura de las copas endometriales que se produce durante la gestación de yeguas servidas con burro resulta en la muerte del embrión por deficiencia de la función lútea solamente cuando la gestación se inicia al final de la época reproductiva de la especie.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA

La estacionalidad reproductiva es una estrategia que permite que los animales se reproduzcan en la época del año que resulte más adecuada para que ocurra el parto en una época favorable, en la que haya una adecuada disponibilidad de alimentos y que el clima sea compatible con la sobrevivencia de las crías (Donadeu y Watson 2007). Por esta razón en las especies en las que la gestación dura algunas semanas (roedores) o alrededor de un año (equinos), el periodo de actividad sexual se desarrolla durante la primavera, de tal forma que las hembras paren en la misma época. En cambio, en aquellas especies en las que la duración de la gestación es aproximadamente seis meses (ovinos y caprinos), el periodo de actividad ovárica se sitúa en el otoño para que los partos ocurran en la primavera. En algunas especies (visón, marsupiales, algunos ciervos y corzo) la estación del año no sólo ejerce una influencia en la producción de gametos por las gónadas, sino también en el momento en que ocurre la implantación. Por ejemplo, en el corzo la fecundación tiene lugar en julio y agosto, pero la implantación se lleva a cabo hasta diciembre-enero y los nacimientos ocurren en mayo-junio (Donadeu y Watson 2007).

Los cambios en la duración del día (fotoperíodo) son el indicador más confiable de la época del año, por lo que el animal utiliza ésta información para saber en que época del año se encuentra. En el hemisferio norte la longitud del día comienza a aumentar a partir del 22 de Diciembre, llegando a su máxima duración el 21 de Junio, para después comenzar a reducirse. En el hemisferio sur los cambios en la dirección de la longitud del día ocurren en las mismas fechas, pero en dirección inversa (el día se alarga a partir de Junio y se acorta a partir de Diciembre). La duración máxima y la duración mínima de las horas luz varían de acuerdo a la latitud. De esta manera, muy cerca de la línea ecuatorial la diferencia entre la duración del día más largo y el día más corto del año es mínima. En cambio, en latitudes alejadas del ecuador puede haber muchas horas de diferencia entre la longitud del día más corto y la del día más largo del año. Sin embargo, independientemente de la longitud máxima o mínima del día, las fechas en la que

ocurre un cambio en la dirección del fotoperíodo son las mismas a cualquier latitud. Por ésta razón, los cambios en la duración del fotoperíodo son predictores exactos de la época del año. No ocurre lo mismo con factores tales como la temperatura, la humedad o la precipitación pluvial, ya que existe una gran variabilidad entre un año y otro (Nagy et al., 2000; Sharp y Ginther, 1975; Sharp et al., 1979; Sharp, 1988).

La yegua normalmente ovula durante la primavera y el verano, por lo que desde el punto de vista reproductivo se considera que es un animal de días largos. Tradicionalmente se habla de “época reproductiva” (primavera-verano). Sin embargo, ésta nomenclatura es inexacta, ya que el manejo que el hombre impone a los animales en muchas ocasiones interfiere con la reproducción. Así, una yegua puede pasar muchos años sin ser servida, por lo que no podemos decir que cada año pase por una “época reproductiva”. Tampoco es adecuado hablar de una “época de anestro” y una “época de estros,” ya que en la yegua es muy común que exista una disociación entre la actividad ovárica y la conducta sexual. Así, es frecuente que se presenten estros anovulatorios durante la época en que los ovarios están inactivos. Por definición el anestro es la ausencia de conducta estral, por lo que sí una yegua presenta estro no podemos decir que está en anestro aunque los ovarios efectivamente estén inactivos. Por lo anterior, lo más conveniente es utilizar la actividad ovárica como base para definir las diferentes épocas del año. Así, podemos decir que la yegua está en la estación anovulatoria durante los meses en los que el desarrollo folicular está disminuido y no llega a presentarse la ovulación, aunque durante éste periodo pueden presentarse estros falsos. Por el contrario, durante la época ovulatoria, las yeguas mantienen ciclos ováricos con ovulaciones a intervalos regulares. Adicionalmente, es necesario hablar de una “época de transición” entre la época anovulatoria y la época ovulatoria, ya que durante éste periodo la actividad ovárica de los animales tiene características especiales (Sharp y Ginther, 1975; Donadeu y Watson, 2007; Sharp, 1988; Sharp et al., 1979).

La mayoría de las yeguas comienzan a ciclar en la primavera y dejan de tener ovulaciones cíclicas durante el otoño e invierno, independientemente de la latitud

en la que se encuentren. Sin embargo, del 10 al 20% de las yeguas presentan ciclos estrales durante todo el año (Palmer y Guillaume, 1992). Una determinada raza está genéticamente programada para comenzar a ciclar en una fecha específica contando a partir del solsticio de invierno, independientemente de la longitud del día en dicha fecha. De ésta manera, los animales no utilizan la duración absoluta del día, sino la dirección del cambio en el fotoperiodo para saber en que época se encuentran (Palmer y Guillaume, 1992). Debido a que la respuesta a los cambios en la dirección del fotoperiodo está genéticamente programada, existen diferencias entre razas en la fecha de inicio y final de la época anovulatoria (Palmer y Driancourt, 1983). Adicionalmente, la variabilidad genética natural en cualquier población provoca que existan diferencias individuales, por lo que siempre habrá yeguas que ovulan durante la época en que sus compañeras de raza se encuentran en plena época anovulatoria (Ginther, 1994). Se ha sugerido que existe un ritmo intrínseco anual en la función reproductiva, el cual es modificado, pero no enteramente controlado por los cambios en el fotoperiodo. En yeguas, la existencia de un ritmo inherente puede estar relacionada a los cambios evolutivos de la propia especie o a los cambios ejercidos por el ser humano, por lo que algunos individuos de la especie han roto con la influencia del fotoperiodo. Se ha sugerido que las prácticas de manejo asociadas con la domesticación de las yeguas han contribuido a la reducción de la estacionalidad reproductiva que antes presentaban en su mayoría los equinos (Palmer y Guillaume, 1992). Así, las características de la estacionalidad reproductiva de una población de yeguas dependen principalmente de la composición genética de dicha población, aunque puede ser modulada por factores como la latitud y el clima en los que se encuentran los animales. Por esta razón, en el primer estudio del presente trabajo se estudió la estacionalidad reproductiva de yeguas criollas en el altiplano mexicano, con el objeto de delimitar su estación reproductiva y poder programar el resto de los experimentos.

4.1.1 Neuroendocrinología de la Estacionalidad

El papel del fotoperiodo en el control de la estacionalidad reproductiva de la yegua se ha demostrado en una serie de experimentos en los que se observó que el periodo de actividad ovárica puede ser desplazado al modificar el régimen de fotoperiodo, sin cambiar otros factores ambientales. Actualmente se sabe que la regulación del ciclo anual es más compleja que una simple respuesta directa al fotoperiodo debido a la existencia del fenómeno de fotorrefractoriedad. De hecho, en la yegua el incremento en las horas luz después del solsticio de invierno no parece ser el responsable del inicio de la actividad ovárica, dado que los animales mantenidos experimentalmente en días cortos a partir del solsticio de invierno comienzan su actividad ovárica al mismo tiempo que aquellos que se mantuvieron en fotoperiodo natural. En estas condiciones el inicio de la actividad ovárica se debe a la aparición de un estado refractario (insensibilidad) a los días cortos después de varios meses de exposición a ellos (Palmer et al., 1982). Estos estados refractarios son sumamente importantes en el desarrollo de la actividad ovárica y son el resultado de la expresión de un ritmo endógeno de reproducción. La función del fotoperiodo es sincronizar y “poner a tiempo” el ritmo endógeno con el ciclo astronómico (Palmer et al., 1982).

La glándula pineal es el mediador entre los fotorreceptores retinianos y el eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal. La vía por la cual la información luminosa alcanza a la glándula pineal en los mamíferos comienza en la retina, que es el fotorreceptor primario del sistema circadiano en estos animales. La actividad nerviosa resultante de la estimulación de la retina es conducida a través de fibras especializadas que pasan directamente al núcleo supraquiasmático del hipotálamo a través del tracto nervioso retino-hipotalámico. Es importante tener presente que el núcleo supraquiasmático tiene la función de actuar como el reloj biológico del organismo, con el cual se ponen a tiempo los ritmos endógenos de los animales. El tracto nervioso retino-hipotalámico, que existe en todos los mamíferos incluyendo los equinos, permite que en el núcleo supraquiasmático se haga una interpretación o ajuste de las señales de luz antes de ser enviadas a la pineal o a

otra parte del cerebro. La existencia del tracto retino-hipotalámico permite que un animal pueda captar la información luminosa y poner a tiempo sus ritmos a pesar de tener una falla en el procesamiento de la visión en la corteza cerebral. Obviamente las lesiones del ojo o aquellas producidas en el trayecto entre el ojo y el núcleo supraquiasmático interferirán con la percepción del fotoperiodo. Sin embargo, las lesiones nerviosas que se produzcan después del núcleo supraquiasmático no tienen efecto sobre los ciclos circadianos (Donadeu y Watson, 2007; Sharp, 1988, Kilmer et al., 1982). Después de que los impulsos nerviosos que llevan información lumínica alcanzan al núcleo supraquiasmático continúan avanzando hasta llegar al ganglio cervical superior, desde donde salen fibras postganglionares simpáticas noradrenérgicas (nervio coronario), que hacen sinapsis con los pinealocitos, que son las células de la glándula pineal encargadas de la producción de melatonina. Los pinealocitos responden a la estimulación simpática con una serie de reacciones bioquímicas que culminan en secreción de melatonina (Donadeu y Watson, 2007).

La duración de la secreción diaria de melatonina esta directamente relacionada con la duración del fotoperiodo, ya que la hormona comienza a secretarse minutos después de comenzar la oscuridad y deja de secretarse al volver a haber luz. De esta manera la pineal actúa como un transductor foto-neuroendocrino mediante el cual el impulso nervioso que trae información luminosa es transformado en una señal hormonal. Así, la duración en la elevación de las concentraciones de melatonina equivale a la duración del periodo de oscuridad. La glándula pineal produce más melatonina durante el invierno debido a que los días son cortos y las noches largas (Grubaugh et al., 1982; Peltier et al., 1998). En las yeguas el incremento en la actividad de la pineal se asocia con una disminución en la actividad ovárica entre diciembre y abril. Al exponerse a los días más largos del final de la primavera o del verano la pineal disminuye su función y la función ovárica se restablece. Sin embargo, el sistema neuro-endócrino que regula los cambios en el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal no solo involucra a la melatonina, si no también a otros neurotransmisores como los opioides y las

catecolaminas, además de aminoácidos excitatorios como la serotonina y hormonas tiroideas como la T3 y T4 (Peltier et al., 1998; Nagy et al., 2000).

Las concentraciones de dopamina en el fluido cerebro espinal del equino se incrementan durante la época anovulatoria, y se ha comprobado que la administración de antagonistas de dopamina promueve la actividad folicular durante el periodo de transición primaveral, pero no tienen efecto durante el anestro profundo. King et al 2005 demostraron la presencia de receptores tipo I y II para dopamina en los ovarios equinos, sugiriendo que una alteración farmacológica en los niveles de dopamina puede afectar directamente la actividad folicular. Otro mecanismo por el cual los cambios en la dopamina pueden afectar la actividad folicular es a través de la prolactina, que es una hormona pituitaria regulada en forma negativa por la dopamina, la cual llega desde el núcleo arcuato a través del sistema porta hipotálamo hipofisiario (King et al., 2005).

Aunque en la pars tuberalis de la adenohipófisis de varias especies existen receptores para melatonina, al parecer estos receptores no juegan un papel en el control de la reproducción, sino en la regulación fotoperiódica de la secreción de prolactina, importante para regular los ciclos de crecimiento y muda de pelo. Las concentraciones de prolactina se incrementan naturalmente durante la primavera, presumiblemente por la caída de los niveles de dopamina asociado al incremento en las horas-luz. Este incremento estacional en las concentraciones de prolactina está relacionado con el cambio de pelaje en los animales (Malpaux et al., 1995).

Por otra parte, en ovejas se han localizado receptores para melatonina en células dopaminérgicas del hipotálamo mediobasal, y se ha sugerido que la activación de dichas neuronas si resulta en una señal inhibitoria para las neuronas productoras de GnRH (Malpaux et al., 1995).

Durante la época anovulatoria el hipotálamo se vuelve muy sensible a la retroalimentación negativa de los estrógenos sobre la secreción de gonadotropinas. De ésta forma, en cuanto un folículo comienza a desarrollarse y a producir estrógenos, la presencia de los mismos en la circulación provoca que se deje de producir LH, por lo que el folículo deja de tener un soporte gonadotrópico y sufre atresia. Sharp (1988), demostró que durante la época anovulatoria la

hormona luteinizante se deja de producir debido a la supresión de la transcripción del gen de la subunidad β de la LH. Como resultado, las concentraciones de LH disminuyen notoriamente en la yegua durante ésta época, a diferencia de las concentraciones de FSH que se continúan secretando en cantidades similares a las encontradas durante la época de primavera-verano. De esta manera la melatonina debe afectar la secreción de GnRH de tal forma que se establezca un patrón que no estimule la transcripción del gen de la subunidad β de LH pero si permita la síntesis del mRNA para la subunidad α de las gonadotropinas y para la subunidad β de la FSH (Sharp, 1988; Sharp et al., 1991; Sherman et al., 1992).

4.1.2 Época ovulatoria

Este término se usa para denominar la época del año en la cual las yeguas son capaces de reproducirse debido a que mantienen actividad ovárica cíclica. Específicamente la época ovulatoria se define como el intervalo desde la primera hasta la última ovulación de la temporada, el resto del año corresponde a la época anovulatoria. En la yegua la FSH provoca la aparición de oleadas periódicas de desarrollo folicular en cualquier época del año, e inclusive durante la gestación. Sin embargo, los folículos solamente llegan a ovular cuando su grado de desarrollo les permite producir una cantidad de estrógenos lo suficientemente elevada para provocar la generación de una elevación preovulatoria de LH, lo que no ocurre durante la época anovulatoria. Al llegar la época ovulatoria; la reducción en la sensibilidad del hipotálamo a la retroalimentación negativa de los estrógenos permite que un folículo se desarrolle lo necesario para producir una cantidad de estrógenos suficientemente elevada para provocar la elevación preovulatoria de LH, la cual a su vez provoca la ovulación. Una vez que el animal ha ovulado y formado un cuerpo lúteo se establece un patrón de ciclicidad ovárica rítmica (ciclo estral) que se mantendrá durante toda la época ovulatoria a menos que exista alguna patología o se presente una gestación. La secreción de FSH y LH está asociada con el desarrollo y maduración de los folículos ováricos. En la yegua la FSH tiene una secreción bifásica o monofásica durante el ciclo estral, y esta es la responsable del desarrollo de las oleadas foliculares en los ovarios (Sharp, 1988).

Durante la estación reproductiva de las yeguas existen generalmente dos picos de FSH en cada ciclo estral, separados entre sí por un intervalo de 10 a 11 días. A esta dinámica se le conoce como liberación bifásica de FSH. Una de estas oleadas coincide con la destrucción del cuerpo lúteo y la caída en las concentraciones de progesterona, lo que permite el inicio del estro y la generación del pico preovulatorio de LH. Al iniciarse el estro pueden estar presentes 3 o 4 folículos de más de 30 Mm. de diámetro, uno de los cuales continuará su desarrollo hasta ovular, mientras que los restantes sufrirán atresia (Miller et al., 1981). La otra oleada de FSH y desarrollo folicular coincide con la etapa de función lútea plena del diestro, por lo que las elevadas concentraciones de progesterona impiden tanto la expresión de signos de estro como la generación de una elevación preovulatoria de LH, lo que generalmente resulta en la atresia de todos los folículos sin llegarse a producir la ovulación (Miller et al., 1981).

4.1.3 Época anovulatoria

La fase de recesión o época de transición otoñal se define como la entrada gradual a la condición de inactividad de los ovarios, que ocurre después de la última ovulación del año. El momento del año en que esto ocurre varía mucho entre individuos, ya que puede ocurrir desde septiembre o hasta principios de diciembre. Esta fase se caracteriza por una falla en la ovulación de los folículos preovulatorios en el tiempo esperado después de la regresión del último cuerpo lúteo. Durante esta etapa el desarrollo folicular se mantiene, sin embargo ningún folículo llega a ovular. Se ha demostrado que las concentraciones de FSH son normales, mientras que la LH está ausente, por lo que es imposible la maduración de un folículo dominante, y mucho menos de la ovulación. Los eventos que suceden durante este periodo han sido poco estudiados debido en parte a la dificultad que supone predecir cuando se presentará la última ovulación del año, fenómeno sumamente variable. No obstante existen suficientes evidencias de que la falla en la secreción de LH es el factor que desencadena la inactividad ovárica en la mayoría de las yeguas (Sherman et al., 1992).

En el otoño, al acortarse el fotoperíodo y hacerse más sensible el hipotálamo a la retroalimentación negativa de los estrógenos se suprime el desarrollo de folículos preovulatorios. Aunque continúan existiendo oleadas de secreción de FSH que estimulan el desarrollo de oleadas foliculares, los folículos que comienzan a crecer y a producir estrógenos dan la señal para que se deje de secretar la LH, que es la hormona responsable del desarrollo folicular final previo a la ovulación, por lo que los folículos de cada oleada terminan sufriendo atresia. Es importante tomar en cuenta que los ovarios poseen su propio mecanismo local que juega un papel importante en la regulación y desarrollo folicular durante la época anovulatoria (Watson y Al-Zi'abi, 2002; Watson et al., 2004). Por otra parte, las bajas concentraciones de LH presentes durante la época anovulatoria provocan que disminuya la vascularización de los folículos, lo que afecta su capacidad de crecimiento y de ovulación. Se ha demostrado que el IGF-I estimula los factores de crecimiento endotelio-vascular (EVFG) en los folículos equinos (Watson y Al-Zi'abi, 2002).

4.1.4 Época de Transición

Conforme se incrementa la longitud del día al acercarse la primavera se induce una gradual reactivación del eje hipotálamo-hipofisiario, lo cual permite el reinicio del crecimiento folicular y la eventual ovulación. El término época de transición se usa frecuentemente para referirse a los cambios entre el periodo anovulatorio y el ovulatorio que ocurren durante la primavera (fase de resurgencia). La fase de resurgencia, o época de transición invernal es definida como el regreso gradual a la época ovulatoria, en la cual se inicia el comportamiento de estro, aumenta la secreción de LH, y comienza a haber desarrollo folicular hasta estadios avanzados, lo que se acompaña por la secreción de esteroides ováricos, que continúa hasta que eventualmente un folículo llegue a ovular (Donadeu y Watson, 2007; Watson, 2007; Watson et al., 2004; Ginther y Gestal, 2005; Seamans y Sharp, 1982).

Esta época de transición invernal tiene una longitud variable que va de 30 hasta 90 días, con un crecimiento folicular variable, siendo diferente en la transición temprana que en la tardía. Diversos estudios indican que durante la época

anovulatoria ocurren ondas foliculares. Hay dos diferentes patrones de crecimiento, que se caracterizan básicamente por la ausencia (anestro profundo) o presencia (periodos de transición otoñal y primaveral) de un folículo dominante en la onda folicular. De hecho el crecimiento del folículo dominante durante la transición de invierno y otoño varía considerablemente entre las yeguas. Durante la época de transición invernal la mayoría de las yeguas desarrollan cada 10 días folículos anovulatorios de más de 30 Mm. de diámetro, los cuales terminan sufriendo atresia para dar paso a una nueva oleada folicular, ocurriendo en promedio de 3 a 4 oleadas antes de dar paso a la primera ovulación del año (Watson y Al-Zi'abi, 2002, Ginther y Gastal 2005, Donadeu y Ginther 2002).

El cese de la actividad ovulatoria al inicio de la época anovulatoria así como el reinicio de la actividad ovulatoria están fuertemente asociadas con el cese e reinicio respectivamente de los patrones de secreción cíclica de LH, cuya supresión durante la época anovulatoria impide que los folículos lleguen a ovular. Las bajas concentraciones circulantes de LH son responsables en parte de la reducción del diámetro folicular durante la época anovulatoria (Donadeu y Watson 2007, Ginther y Gastal 2005, Donadeu y Ginther 2002).

El incremento en la pulsatilidad y en las concentraciones circulantes de LH durante la transición invernal actúa como desencadenador del desarrollo de un folículo dominante después del anestro profundo. Durante esta época algunas yeguas presentan folículos grandes anovulatorios con altos niveles de secreción de LH hipofisiaria, que sin embargo aún no son suficiente para desencadenar la ovulación. La presencia de la LH es indispensable para el crecimiento y desarrollo de folículos dominantes, así como para que adquieran la capacidad ovulatoria al final de la transición invernal a la primavera. El folículo dominante tiene menor respuesta a la LH durante esta transición que durante la época ovulatoria, lo que se debe a los bajos niveles de receptores de LH en las células de la teca y la granulosa, que a su vez se deben a los bajos niveles de LH circulante, ya que esta hormona estimula la síntesis de sus propios receptores. Por esta razón durante la época transicional existe crecimiento y desarrollo de folículos, pero no lo suficiente para lograr una ovulación. Los folículos presentes durante la época de transición

tienen además una capacidad disminuida para sintetizar andrógenos, estrógenos y progesterona debido a deficiencias enzimáticas en los principales pasos de la esteroidogénesis (Donadeu y Watson, 2007; Donadeu, y Ginther, 2002; Silvia et al., 1987).

4.1.5 Estacionalidad de la foliculogénesis y la función lútea durante la gestación

En la yegua gestante la FSH hipofisiaria es la hormona responsable de estimular el crecimiento folicular para el desarrollo de los cuerpos lúteos secundarios. Existen folículos maduros entre el día 19 y 23 de la gestación, los cuales generalmente no llegan a ovular debido a que la presencia de progesterona inhibe la elevación preovulatoria de LH. Posteriormente siguen presentándose oleadas foliculares a intervalos de 10 a 12 días debido a que la FSH hipofisiaria es liberada en forma rítmica durante este periodo sin importar si la yegua está vacía o gestante. Este patrón de liberación de FSH es controlado principalmente por la inhibina secretada por los folículos y no por la retroalimentación negativa de la progesterona u hormonas esteroideas. El patrón de secreción de FSH continúa durante una gestación temprana que transcurra durante los meses de primavera y verano, los cuales corresponden con una plena época reproductiva. En estas condiciones la FSH estimula el crecimiento de los folículos, mientras que la eCG producida a partir del día 35 de la gestación induce el desarrollo final del folículo maduro para que ocurra la ovulación. Se ha propuesto que el fotoperiodo puede modificar la secreción de FSH y con ello el desarrollo folicular durante la gestación, ya que las yeguas que conciben al final de la época ovulatoria y pasan los primeros meses de la gestación durante la época anovulatoria generalmente desarrollan un menor número de cuerpos lúteos secundarios que las que están gestantes en plena época reproductiva, a pesar de que la secreción de eCG se mantiene igual que en plena época ovulatoria (Allen, 1984; Urwin y Allen, 1982).

La gestación equina temprana (20-60 días) se caracteriza por tener bajas concentraciones de LH debido a la retroalimentación negativa ejercida por la

progesterona, la cual sin embargo no inhibe la secreción de FSH. Esto resulta en el desarrollo continuo de folículos dominantes que no llegan a ovular. Sin embargo a los 45-50 días de la gestación puede ocurrir una ovulación debido a la estimulación de la eCG, que comienza a secretarse por las copas endometriales. Normalmente la mayoría de las yeguas quedan gestantes al inicio de la estación reproductiva, por lo que los primeros 120 días de su gestación transcurren durante la plena época reproductiva, cuando la secreción de LH hipofisiaria puede ser suficiente para mantener la función lútea sin necesidad de recurrir a la eCG. En cambio, si por cualquier razón la yegua queda gestante hacia el final de la época reproductiva, la primera parte de la gestación transcurrirá durante la época de inactividad ovárica, cuando las concentraciones de LH se encuentren fuertemente inhibidas. Es posible que sea precisamente en éstos casos cuando la eCG cumpla su papel, ya que su producción y secreción no están sujetas a un control estacional. Así la eCG podría haber evolucionado con el objeto de sustituir a la LH hipofisiaria cuando la concepción se produce hacia el final de la época reproductiva (Allen, 1984). De ser esto cierto, una deficiente producción de eCG podría causar más problemas en gestaciones que se inician al final de la época ovulatoria, que aquellas cuya primera mitad transcurre en plena época ovulatoria. La yegua gestante con embrión mula es un modelo natural para estudiar los efectos de una deficiente secreción de eCG. Por ésta razón, en el segundo experimento de éste trabajo se comparó la incidencia de la pérdida de la gestación en yeguas servidas con burro y yeguas servidas con caballo durante el inicio de la época ovulatoria y al final de dicha época. Además en ambas épocas se realizó un seguimiento ultrasonográfico de la gestación y se realizaron mediciones seriadas de progesterona, sulfato de estrona y eCG con el objeto de obtener información sobre las posibles causas de pérdida de gestación en cada época del año.

4.2 PÉRDIDA DE LA GESTACIÓN

4.2.1 Muerte embrionaria temprana

La muerte embrionaria en la yegua se define generalmente como la muerte del producto antes del día 40 de la gestación. Después de esta edad gestacional el producto se denomina feto, por lo que una pérdida de la gestación se denominaría muerte fetal o aborto. Se han descrito muchas causas de muerte embrionaria en yeguas, incluyendo anomalías cromosómicas letales en el producto, endometritis crónica, quistes endometriales, insuficiencia lútea y estrés nutricional (Ball et al., 1987).

Tanto el diagnóstico de pérdida embrionaria temprana como el estudio de los factores predisponentes han mejorado enormemente mediante el uso de la ultrasonografía para el diagnóstico de gestación. La ultrasonografía transrectal se utiliza rutinariamente en la reproducción equina para el diagnóstico de gestación desde los 12 o 14 días post-ovulación, mientras que en trabajos de investigación se pueden realizar desde el día 9 o 10 post-ovulación (figura 1). Antes de estas fechas la vesícula embrionaria es demasiado pequeña para ser localizada mediante ultrasonografía, por lo que se han utilizado otras técnicas para estudiar las pérdidas embrionarias muy tempranas. Específicamente, antes del día 11 de la gestación se han utilizado técnicas de reproducción asistida como la transferencia de embriones, transferencia de ovocitos y el cultivo de embriones *in Vitro*, para estudiar el desarrollo embrionario y las pérdidas embrionarias (Ball et al., 1987).

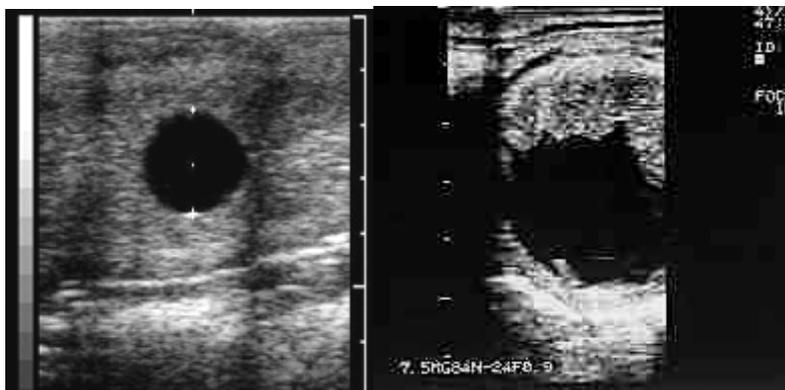


Figura 4.1 Vesículas embrionarias de 12 (izquierda) y 21 días (derecha) respectivamente.

La primera imagen se obtiene realizando un diagnóstico de gestación temprano, mientras que la segunda imagen es un diagnóstico rutinario.

Este tipo de estudios han permitido reconocer que la pérdida embrionaria es la mayor causa de infertilidad aparente y reducción en la eficiencia reproductiva en las yeguas. Los porcentajes de fertilización normales en yeguas fértiles son superiores al 90%. Aún en yeguas subfértiles los porcentajes de fertilización varían entre el 80 y el 90 %. Sin embargo, entre la fertilización y el momento del diagnóstico temprano de gestación en el día 10 post-ovulación puede haber entre 10 y 15 % de mortalidad embrionaria, mientras que entre el día 11 y 50 de la gestación se ha encontrado aproximadamente un 10% de mortalidad embrionaria. La incidencia acumulada de mortalidad embrionaria desde la fertilización hasta día 40 en yeguas fértiles es de alrededor del 20%, y hasta el 70% en yeguas subfértiles (Carnevale y Ginther, 1995). En un estudio llevado a cabo en 356 yeguas diagnosticadas como gestantes con ultrasonografía la incidencia de muerte embrionaria temprana (MET) hasta los 50 días postovulación fue del 17.3%. La mayoría (77%) de las MET ocurrieron antes del día 35 postovulación, concentrándose entre los 15 y 20 días, que corresponden al periodo de reconocimiento materno de la gestación, o entre los 30 y los 35 días, que coinciden con el inicio de la secreción de eCG (Ball, 1993; Vanderwall y Newcombe, 2007).

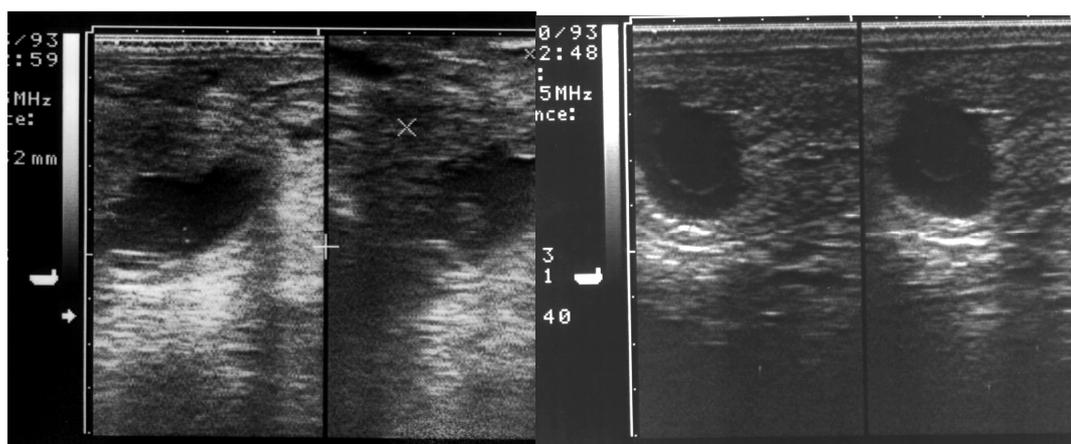


Figura 4.2 Imágenes ultrasonográficas de vesículas embrionarias de 25 y 30 días de gestación donde se observa mortalidad embrionaria. En la primera imagen se observa una vesícula contraída así como pérdida de volumen. En la segunda imagen se observa un anillo ecogénico dentro de ella.

La falla temprana en la gestación puede estar relacionada con una reducida producción de progesterona a través de varios mecanismos: 1) Insuficiencia lútea primaria, 2) Falta de apoyo gonadotrópico al cuerpo lúteo, 4) Falta en el reconocimiento materno de la gestación, 3) Luteólisis debida a inflamación uterina (endometritis) acompañada por liberación de prostaglandina F_{2α}, 4) Luteólisis debida a liberación de prostaglandina F_{2α} como resultado de una endotoxemia y 5) Inhibición de la función ovárica asociada a estrés. Otras causas de muerte embrionaria no relacionadas con deficiencias en la producción de progesterona incluyen el consumo de plantas estrogénicas y las gestaciones gemelares (Ball, 1993; Bergfelt et al., 1992).

La insuficiencia lútea ha sido propuesta como una causa de falla temprana de la gestación. Sin embargo, no hay evidencias que demuestren que pueda ocurrir una insuficiencia lútea primaria durante los primeros 20 días de la gestación. Lo que si puede ocurrir es una luteólisis prematura inducida por la inflamación del útero acompañada por liberación de prostaglandinas F_{2α}, lo que ocasiona que el diestro se acorte. Esta luteólisis asociada a endometritis es una de las causas más comunes de pérdida de la gestación antes del día 20 (Ball, 1993). Entre el día 14 y 18 de la gestación la causa más común de mortalidad embrionaria es la falla en el reconocimiento materno de la gestación, lo que puede deberse a “asincronía materno-embionaria” (desarrollo lento del embrión, secreción prematura de PGF_{2α} uterina debido a endometritis), así como a alteraciones en la movilidad embrionaria (adherencias, quistes endometriales, etc.) (Ball, 1993).

A diferencia de lo que ocurre en yeguas fértiles, la mayor proporción de muerte embrionaria temprana (MET) en yeguas subfértiles ocurre cuando el embrión aún se encuentra en el oviducto. Se estima que entre el 5 y el 30 % de los óvulos fertilizados resultan en embriones que mueren en el oviducto (Ball et al., 1987; Carnevale y Ginther 1995). La ultrasonografía no puede detectar la vesícula embrionaria equina antes del día 10 post-concepción. Sin embargo, varios trabajos basados en la recuperación y transferencia de embriones demostraron una elevada incidencia de pérdida embrionaria muy temprana en yeguas subfértiles,

que explica la marcada disminución en la recuperación de blastocistos a partir del útero de yeguas viejas. Además, los blastocistos de yeguas viejas tienen defectos morfológicos y sobreviven menos al ser transferidos a yeguas receptoras sanas (Ball et al., 1987; Carnevale y Ginther, 1995; Vanderwall y Newcombe, 2007).

Clínicamente, las anormalidades del endometrio han sido consideradas como un factor importante en la disminución de la fertilidad de las yeguas viejas. Algunos autores describieron cambios degenerativos en el endometrio equino asociados con la edad de la yegua y la disminución de la fertilidad al avanzar la edad. Los cambios incluyen endometriosis y endometritis, así como cambios vasculares. Ball et al (1987), investigaron el impacto del ambiente uterino sobre la sobrevivencia embrionaria en yeguas jóvenes y viejas mediante la evaluación de los cambios histopatológicos endometriales. Como se esperaba, las yeguas viejas tuvieron mayor incidencia de cambios inflamatorios y degenerativos en el endometrio. Sin embargo al transferir blastocistos morfológicamente normales de 7 días al útero de yeguas receptoras jóvenes o yeguas viejas, los porcentajes de sobrevivencia embrionaria hasta el día 12 no variaron significativamente, siendo de 55% en yeguas jóvenes y 45% en yeguas viejas. Este estudio sugiere que los defectos uterinos no juegan un papel importante en la alta incidencia de muerte embrionaria temprana detectada previamente en las yeguas viejas, en las que la mortalidad podría estar más bien asociada a defectos en los ovocitos. También es posible que el impacto de las anormalidades uterinas sea más importante en períodos más tardíos de la gestación de yeguas viejas (Ball, 2000).

Carnevale y Ginther (1995) comunicaron los resultados de estudios sobre transferencia intratubárica de gametos, en los que los ovocitos obtenidos de yeguas jóvenes y viejas eran transferidos al oviducto de yeguas receptoras jóvenes. Los ovocitos de yeguas viejas dieron como resultado menor número de gestaciones que los obtenidos de yeguas jóvenes, lo que constituye la evidencia más convincente hasta el momento de que existe una disminución en la calidad del ovocito relacionada con la edad de la yegua, lo que debe considerarse como un factor importante en la disminución de la fertilidad de las yeguas. Se ha propuesto que la ovulación retardada y el envejecimiento del ovocito se combinan

para resultar en la producción de ovocitos poco viables en las hembras viejas, las que aparentemente experimentan una senectud reproductiva caracterizada por alargamiento de la fase folicular, ovulaciones irregulares y eventualmente inactividad ovulatoria (Carnevale y Ginther, 1995).

4.2.2 Muerte embrionaria tardía y muerte fetal

Después del reconocimiento de gestación, y con fines del presente trabajo, las causas de mortalidad se pueden dividir en dos grupos:

1.- Factores que lesionan directamente al producto, por lo que su muerte antecede a la destrucción del cuerpo lúteo (mortalidad primaria) (Ball, 1993) y 2.- Factores que provocan una deficiente función lútea o regresión prematura del cuerpo lúteo, por lo que la falta de soporte progestacional resulta posteriormente en mortalidad embrionaria (mortalidad secundaria) (Allen, 2001a).

4.3 GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA (eCG)

Los primeros investigadores en descubrir la existencia de la gonadotropina coriónica equina fueron Harold Cole y George Hart de la Universidad de California en Davis, los cuales le dieron originalmente el nombre de PMSG (gonadotropina sérica de yegua gestante) y demostraron que se produce en las copas endometriales de la yegua gestante (Roser, 1999). Posteriormente, William (Twink) Allen y sus colaboradores descubrieron que las copas endometriales se originan a partir de células coriónicas que invaden el endometrio y proliferan hasta formar las copas endometriales. Por ésta razón Harold Papkoff y sus colaboradores propusieron cambiar el nombre de la hormona a gonadotropina coriónica equina (eCG), en reconocimiento al hecho de que es producida por células del corion (Roser, 1999; Stewart et al., 1995).

4.3.1 Formación y Destrucción de las Copas Endometriales

Alrededor del día 25 de la gestación equina aparece en la superficie del trofoblasto una banda delgada de tejido blanquecino que lo rodea a la altura del sitio de contacto entre el saco vitelino en regresión y el alantoides en crecimiento. Esta banda ecuatorial, llamada cinturón coriónico, está formada por células binucleadas hiperplásicas, que entre el día 36 y 38 crecen, se multiplican y adquieren movimiento ameboideo. Dichas células se desprenden del corion e invaden el endometrio materno, para lo cual secretan proteinasas de tipo “metalo-proteínas” que las ayudan a atacar la matriz extracelular para insertarse en el endometrio

(Roser,1999; Vagnoni et al., 1995). El carácter agresivo de las células binucleadas les permite migrar hacia el interior de las glándulas endometriales, donde comienzan a secretar eCG y proliferan hasta formar estructuras macroscópicas denominadas copas endometriales. A partir del día 55 de la gestación la porción apical de las glándulas endometriales, en cuyo interior se han formado las copas endometriales, es obliterada, mientras que las regiones basales permanecen intactas, aumentan de tamaño y se distienden progresivamente debido tanto a la proliferación de células como a la acumulación de sus secreciones. Dentro de cada glándula se acumulan grandes cantidades de carbohidratos que se depositan en la superficie de la copa endometrial hacia el día 70 de la gestación (Roser, 1999; Stewart et al., 1995).

Durante la etapa de máximo crecimiento y secreción hormonal (día 55 al 70) las copas toman una forma circular, siendo visibles en forma de placas pálidas en la superficie del endometrio, a la altura de la base del cuerno gestante (Roser, 1999; Stewart et al., 1995; Allen, 1982).

El tamaño y forma de las copas endometriales varía desde pequeños círculos de 1 a 2 Mm. de diámetro hasta grandes cintas de 3 a 5 cm. de ancho. La forma y grado de desarrollo que alcancen las copas depende en parte de las características genéticas de los padres del embrión, y en parte de la configuración del endometrio al cual invadirán. Al tratarse de células embrionarias con una composición genética distinta a la de la madre, la invasión de células del cinturón coriónico provoca desde el principio una reacción de tipo inflamatorio en la madre. Al inicio de la invasión, entre el día 36 y 38, se acumula un número significativo de linfocitos en el estroma subepitelial del endometrio. Estos linfocitos desaparecen temporalmente del tejido mientras las células del cinturón forman las copas endometriales. Hacia el día 50 de la gestación los linfocitos reaparecen e incrementan su número. Entre el día 60 y 80 de la gestación las copas endometriales están en plena funcionalidad a pesar de la presencia de inmunidad celular, compuesta en su mayoría por linfocitos T y algunos macrófagos. Conforme avanza la gestación comienzan a reunirse más células del sistema inmune, incrementándose el número de linfocitos B, células plasmáticas y eosinófilos en el

estroma endometrial y en la periferia de la copa. Durante esta etapa de la gestación las copas endometriales permanecen fuertemente unidas al endometrio, secretando grandes cantidades de eCG a la circulación periférica (Allen et al., 1993).

Las células invasoras expresan el Antígeno Mayor de Histocompatibilidad clase I (MHC-I) de origen paterno, que es capaz de estimular una gran respuesta humoral y celular por parte del sistema inmune de la madre. La magnitud de la respuesta inmune depende en gran parte de la compatibilidad o incompatibilidad entre el tipo de MHC-I propio de la madre y el que el embrión ha heredado de su padre. Así, durante la gestación temprana los anticuerpos citotóxicos contra los antígenos del MHC-I paterno aparecen rápidamente después del desarrollo del cinturón coriónico en caso de que las yeguas estén gestantes con fetos con antígenos incompatibles. Estos anticuerpos generalmente son detectables a partir del día 60 de la gestación en yeguas primíparas, o aproximadamente 20 días después de que las células del cinturón coriónico invaden el endometrio. Para el día 70 a 80 de la gestación las células de las copas comienzan a degenerarse debido a que los leucocitos comienzan a invadirlas y destruirlas. Tanto los cambios degenerativos progresivos como la acumulación de células necróticas en la superficie de la copa comienzan a distender la glándula endometrial. En una gestación normal de caballo con yegua la reacción inmune que se desencadena desintegra totalmente las copas endometriales hacia los días 140 a 160 de la gestación, sin afectar a la placenta ni al producto (Stewart et al., 1995; Allen, 1993; Allen et al., 1973).

Sorprendentemente la respuesta humoral y celular que la madre dirige en contra de los antígenos de histocompatibilidad del embrión equino no compromete la gestación (Roser, 1999; Allen, 1982; Allen et al., 1993). Esto al parecer se debe a que la reacción inmune solamente ocurre a nivel de las copas endometriales, a pesar de que tanto la placenta como el embrión también tienen antígenos paternos de tipo MHC-I extraños a la yegua. El mecanismo por el cual la unidad feto-placentaria evade el ataque del sistema inmune de la madre tiene que ver con la naturaleza inmune del trofoblasto, que es el tejido que forma la primera barrera

entre la madre y el feto. El útero gestante ha sido descrito como un sitio inmunológicamente privilegiado, en el cual el feto antigénicamente extraño es protegido de la respuesta inmune materna (Allen, 1982; Kydd et al., 1982). En la mayoría de las especies, incluyendo la yegua, el trofoblasto no expresa sus antígenos MHC-I y MHC-II, y la ausencia de éstas moléculas dificulta el ataque por parte del sistema inmune materno, a pesar de que el suero de la yegua tiene altas concentraciones de linfocitos específicos contra los MHC-I del padre del embrión que se está desarrollando en ella. En contraste, las células de las copas endometriales si expresan los antígenos de histocompatibilidad, además de que se encuentran muy expuestas al ataque por el sistema inmune materno debido a que están incrustadas dentro del endometrio (Stewart et al., 1995; Allen, 1982; Allen et al., 1993).

En las yeguas que llevan fetos con antígenos MHC-I compatibles con los propios no se detectan títulos de anticuerpos citotóxicos en muestras de suero colectadas durante la gestación (Adams et al., 2007).

Entre los días 100 y 140 de la gestación, tanto el material necrótico de las copas como sus secreciones se depositan en la superficie de la copa, adhiriéndose a la capa más externa del corioalantoides. Esto provoca que en algunas áreas del cuerno gestante se formen sacos de material necrótico, formando las llamadas "bolsas coriónicas" (Roser, 1999; Murphy y Martinuk, 1991).

Como resultado de todo lo anterior, en una gestación normal resultado de la cruce de un caballo con una yegua, las copas endometriales producen eCG y estimulan la función lútea a partir del día 35-40 de la gestación, produciendo altas concentraciones de eCG (20-300 UI/ml) hasta los días 120-150 de la gestación, cuando las copas son rechazadas inmunológicamente por la madre. En algunas yeguas la secreción de eCG se llega a prolongar más allá del día 150 de la gestación. (Stewart et al., 1995).

En cambio, en las gestaciones híbridas entre diferentes especies de équidos se producen alteraciones que resultan en importantes diferencias en la formación, mantenimiento y destrucción de las copas endometriales. La diferencia entre la cantidad de eCG y progesterona secretadas en las gestaciones híbridas depende

del tipo de copas endometriales que se formen (Allen et al., 1973). Así, cuando una yegua es cruzada con burro con el objeto de producir una mula, las copas endometriales derivadas de las células coriónicas del embrión mula son rechazadas muy rápidamente, entre la séptima y decimoprimer semana de la gestación, por lo que las concentraciones de eCG se reducen en forma muy prematura o en ocasiones ni siquiera llegan a elevarse (Allen et al., 1993b). Esto al parecer es debido a una respuesta muy eficiente del sistema inmune de la yegua en contra de los antígenos de histocompatibilidad de burro presentes en el embrión híbrido, ya que en yeguas que lleven gestaciones híbridas (embrión mula) la acumulación de linfocitos alrededor de las copas endometriales es mucho mayor comparado con lo encontrado en gestaciones intraespecies (Allen, 1982).

Al parecer los efectos del sistema inmune de la madre sobre el desarrollo de las copas endometriales en gestaciones con embrión mula comienzan desde muy temprano, ya que el desarrollo de cada una de las copas endometriales es escaso, por lo que la cantidad total de tejido del conjunto de todas las copas endometriales es apreciablemente menor que el de las yeguas que llevan un embrión equino. Esto tiene como resultado que en las gestaciones mulares el cinturón coriónico sea más estrecho que en las gestaciones equinas (Roser, 1999; Allen, 1982).

A pesar de este pobre desarrollo de las copas endometriales, y por lo tanto de la reducida cantidad de tejido potencialmente antigénico en yeguas con gestaciones mulares, la reacción linfocitaria por parte de la madre es más agresiva que la que se desarrolla en yeguas con embriones equinos, por lo que para el día 50 de la gestación hay ya un gran número de linfocitos alrededor de cada copa endometrial, los que invaden y atacan el tejido de origen fetal de las copas endometriales. Como resultado, en las gestaciones mulares a más tardar entre el día 60 y 70 de la gestación se destruyen prematuramente las copas endometriales y desaparece la eCG de la circulación materna (Roser, 1999; Allen, 1982).

La destrucción prematura de las copas endometriales en las gestaciones mulares no necesariamente afecta a la gestación, ya que Boeta y Zarco (2005) encontraron que un número elevado de las yeguas servidas con burro llevaron su gestación a término en forma normal a pesar de que sus concentraciones de eCG siempre se

mantuvieron muy reducidas, o incluso llegaron a permanecer basales a lo largo de toda la gestación (Boeta y Zarco, 2005).

En contraste con lo descrito en los párrafos anteriores, en burras que son montadas por caballos, resultando en embriones burdéganos, las concentraciones de eCG llegan a ser 5 a 8 veces más elevadas que las encontradas en gestaciones de yegua con caballos (Allen et al., 1993b). En las gestaciones de embrión burdégano, el cinturón coriónico que se desarrolla en la burra es más ancho y voluminoso que el formado durante una gestación normal de embrión burro, por lo que se desarrollan copas endometriales más activas y grandes, que producen concentraciones séricas muy elevadas de eCG. Como en el caso de las gestaciones mulares, la reacción linfocitaria dirigida en contra de las copas endometriales es considerablemente más agresiva en gestaciones de fetos burdéganos. Sin embargo, hay una marcada diferencia con respecto a la gestación de embrión mula, ya que los linfocitos acumulados tienen una menor capacidad de penetración y destrucción en contra de las copas endometriales de gestaciones de burdéganos. En este caso los linfocitos permanecen agrupados en el estroma periférico del endometrio, sin invadir las copas endometriales por mucho más tiempo que en otro tipo de gestaciones, lo que permite que se prolongue la secreción de eCG y se alargue la vida del cuerpo lúteo y (Roser, 1999; Allen, 1982). Finalmente, en mulas a las que se les transfirieron embriones equinos sus niveles de eCG se mantuvieron en rangos similares (Davies et al., 1985) o menores (Camillo et al., 2003) a los que se presentan en yeguas servidas con caballo.

4.3.2 Clasificación y Estructura Bioquímica de la eCG

La gonadotropina coriónica equina pertenece a la familia de las hormonas glicoproteicas, que incluye a la Hormona Luteinizante (LH), la Hormona Folículo Estimulante (FSH), la Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH) y la Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). La LH, FSH y TSH son producidas en la adenohipófisis, mientras que la eCG y la hCG, como su nombre lo indica, son

producidas en células de origen coriónico de la placenta (Roser, 1999; Murphy y Martinuk, 1991; Allen, 2001b).

Las hormonas glicoproteicas están constituidas por una subunidad α y una subunidad β . La subunidad- α es común para todas las hormonas glicoproteicas de una determinada especie, por lo que se asume que está codificada por un solo gen; mientras que la subunidad β es específica de cada hormona y es la que le confiere especificidad biológica a cada una de ellas. Las subunidades β de las hormonas glicoproteicas están codificadas por genes distintos para cada hormona, los cuales han evolucionado a partir de un gen ancestral común, por lo que tienen una cierta homología de secuencia (Roser, 1999; Murphy y Martinuk, 1991; Allen, 2001b).

La eCG es una molécula de alto peso molecular y es la más glicosilada de todas las hormonas glicoproteicas pituitarias o placentarias, ya que el 45% de su masa está constituida por carbohidratos. Aproximadamente el 20% de la subunidad α y más del 50% de la subunidad β son carbohidratos (Allen, 2001c).

La subunidad α de la eCG consiste de 96 aminoácidos, con dos sitios de glicosilación en los grupos amino (unión tipo N-) de los residuos de asparagina localizados en las posiciones 56 y 82 de la molécula, mientras que la subunidad β consiste de 149 aminoácidos con un sitio de glicosilación (N-) en la asparagina 13, y entre 4 y 6 sitios de glicosilación en los grupos hidroxilo (unión tipo O-) de diversos residuos de serina. Los oligosacáridos localizados en cada sitio de unión incluyen moléculas de manosa, galactosa, N-acetil glucosamina y ácido siálico, destacando el alto contenido (14%) de éste último en los extremos terminales de los oligosacáridos, lo que propicia que la eCG tenga una vida media muy larga en la circulación (Murphy y Martinuk, 1991; Bousfield et al., 1987).

La subunidad α de las hormonas glicoproteicas del equino (incluyendo a la eCG) tiene entre un 70 % y un 80% de homología de secuencia con las subunidades α de gonadotropinas de otras especies de mamíferos. Se caracteriza por tener, en relación con otros mamíferos, una transposición en los aminoácidos tirosina 87 e histidina 93 (Christakos y Bahl, 1979).

Las subunidades β de la eCG y la LH equina tienen una secuencia idéntica de aminoácidos, ya que son codificadas por un mismo gen que es expresado en el primer caso en la placenta y en el segundo en la adenohipófisis. Sin embargo, se trata de diferentes hormonas ya que el patrón de glicosilación es distinto para cada una de ellas, lo que les confiere propiedades diferentes (Murphy y Martinuk, 1991; Bousfield et al., 1987). Por otra parte, las subunidades β de la eCG y la LH equina tienen varias diferencias con respecto a las de la LH de otras especies, por lo que cuando se administran a especies no equinas tienen efectos parecidos a los de la FSH. Una de las diferencias importantes con respecto a otras especies es una secuencia adicional de 30 aminoácidos localizados en la terminal carboxilo de la subunidad β de la eCG y la LH equina. Esta secuencia carboxipeptídica está restringida solamente a los équidos y a los primates (Nakav et al., 2005).

Para que la eCG funcione adecuadamente se requieren ambas subunidades. Las subunidades aisladas (α o β), tienen aproximadamente de 4 a 6% de la actividad de la molécula intacta (Chopineau, et al., 1997). Las diferencias entre la subunidad α de la eCG y la LH con respecto a las de otras especies son importantes para la actividad biológica de las hormonas, por lo que la hibridación de subunidades provenientes de diferentes especies resultan en pérdida o modificación de la actividad biológica. Así, cuando se combina una subunidad α de otra especie con la subunidad eCG- β o LH β se produce una sustancia biológicamente inactiva. En contraste, la combinación entre la subunidad α equina con la subunidad LH- β ovina produjo una hormona casi tan potente como la eCG o la LH equina. Cuando se combinó la subunidad α equina con la LH- β porcina, la recombinación fue equivalente a la LH equina y casi 50 veces más potente que la LH porcina (Roser, 1999).

Se ha observado que la subunidad α de la LH equina por si sola se une a receptores de FSH de otras especies, inhibiéndolos, por lo que la subunidad α puede ser importante para que la eCG se una a los receptores de FSH de otras especies, requiriéndose además la subunidad β para que la unión al receptor resulte en estimulación (Roser, 1999). Chopineau et al. (1997) demostraron que

la subunidad β de las gonadotropinas equinas determina su actividad como FSH o LH. Sin embargo al recombinar a la subunidad β de LH o eCG de burro con la subunidad α porcina no se encontró actividad de FSH, solamente de LH, lo que sugiere que puede haber diferencias biológicas importantes entre la subunidad β de la eCG de burro y la de caballo. Esto explicaría el porqué la gonadotropina coriónica de burro tiene en otras especies 10 veces menos actividad de FSH que la eCG. Además, la subunidad α puede influir en la especificidad de las gonadotropinas (Chopineau et al., 1997).

4.3.3 Propiedades Biológicas de la eCG

Se ha sugerido que la variación en la cantidad de eCG circulante en una yegua gestante puede ser atribuida a la combinación garañón/yegua responsable de la gestación, por lo que es posible seleccionar a yeguas y sementales que incrementen las concentraciones de eCG (Manning et al., 1987). Las variaciones genéticas individuales también pueden resultar en diferencias en la actividad de la eCG, ya que se ha comprobado que la actividad de LH de la eCG varía de acuerdo con el semental usado, más no de acuerdo con el día de la gestación (Manning et al., 1987; Martinuk et al., 1991).

Tanto la eCG como la eLH poseen estructuras primarias idénticas, por lo que se unen a los mismos receptores en los órganos reproductivos de la yegua, a los que se les denomina receptores de eCG/LH. Sin embargo, existe una diferencia importante en la afinidad de ambas hormonas por el receptor eCG/LH, siendo la eCG mucho menos potente que la LH. La diferencia de afinidad se debe a las diferencias en el complemento de carbohidratos de ambas hormonas, con el resultado de que la eCG tiene mucha menor afinidad por los receptores que la eLH. También se sabe que debido al alto contenido de ácido siálico de la subunidad β de la eCG, esta hormona tiene una vida media más larga que la eLH en la circulación materna (Martinuk et al., 1991). Como resultado, las concentraciones circulantes de eCG durante los días 35 a 120 de la gestación equina son cientos o miles de veces más elevadas que las de la eLH, lo que compensa por su reducida afinidad por los receptores (Roser, 1999).

La LH equina es removida mucho más rápidamente que la eCG de la circulación sistémica debido a que sus carbohidratos tienen una terminación SO₄-4GalNAc, lo cual hace que los receptores de las células endoteliales hepáticas capturen a la LH, retirándola de la circulación y reduciendo su vida media. En cambio, los carbohidratos de la eCG tienen una terminación Sia α 2,3Gal lo que le permite tener una vida media mucho más larga (6 días) que la de la eLH (4-5 hrs.) (Smith et al., 1993).

En general la desglicolización de una hormona glicoproteica como la LH incrementa su unión a los receptores de sus células blanco pero disminuye su actividad biológica, lo que sugiere que los carbohidratos son componentes importantes del mecanismo de transducción de la señal. La eCG se une a los receptores de eLH/CG con sólo un 2.5 a 3.9% de afinidad que la eLH debido a su gran contenido de carbohidratos (Martinuk et al., 1991).

La eCG es la única molécula que expresa actividad biológica de FSH y LH cuando se administra a otras especies mamíferas, por lo que ha sido muy utilizada para la superovulación en otras especies. Esta propiedad es contrastante con la de la gonadotropina coriónica humana (hCG), que solo tiene actividad biológica de LH. La actividad de FSH de la eCG no se manifiesta en el equino, en el que solamente tiene actividad de LH (Bousfield et al., 1987).

La gonadotropina coriónica de burro (dCG) también muestra actividad de FSH en especies no equinas, pero con una menor actividad que la eCG. El ratio de FSH-LH en la eCG es de 1.0 comparado con 0.1 de la dCG. En la cruce de equino y burro (embriones mulas o burdéganos) el grado de actividad es intermedio (0.5). Por esta razón la LH y CG de burro también tienen un efecto de FSH en otras especies, pero 10 veces menos potente que las correspondientes hormonas equinas. Por otra parte el grado de glicosilación de la dCG es mucho menor que el de la eCG, ya que la dCG tiene solamente un 31% de carbohidratos, en comparación con la eCG, que tiene el 45% (Roser et al., 1984).

En ensayos de radioreceptores para medir la actividad de FSH y LH de la eCG se ha demostrado que no es la diferencia en la cantidad de gonadotropina coriónica circulante, sino en la actividad biológica intrínseca de la hormona, lo que resulta en

las grandes diferencias en el desarrollo de cuerpos lúteos secundarios que se observan al comparar las gestaciones de burras con las de yeguas (Roser et al., 1984).

La eCG se une con baja afinidad a los receptores de las gonadotropinas en los tejidos gonadales de otros mamíferos y del propio tejido ovárico o testicular del equino, mostrando solamente del 1 al 2% de capacidad de unión que la LH equina. Este bajo porcentaje de unión de la eCG a los receptores gonadales es un mecanismo de protección que evita que los ovarios de la yegua sean estimulados excesivamente cada vez que la hembra queda gestante. Durante la gestación equina la FSH hipofisiaria continúa estimulando oleadas de desarrollo folicular, de las que se producen 10 a 12 durante la primera mitad de la gestación. Sin embargo, es la acción de LH de la eCG, y no la LH de origen hipofisiario, lo que provoca la ovulación y/o luteinización de folículos durante la gestación, resultando en la formación de cuerpos lúteos secundarios para mantener la producción de progesterona entre los días 40 y 140 de la gestación (Roser et al., 1984; Squires y Ginther, 1975).

Entre la LH hipofisiaria y la eCG se logra estimular poderosamente a los ovarios maternos, por lo que es difícil imaginar una deficiencia lútea durante la gestación equina. Sin embargo, se han creado algunos modelos experimentales para evaluar los efectos de la deficiencia en la producción de eCG. En un experimento se realizó la bisección de una mórula mula de 6 días de edad, lo que fue seguido por la transferencia de los hemi-embiones a dos diferentes madres receptoras, una yegua y otra burra, lo que resultó en diferencias dramáticas en los perfiles hormonales durante la primera mitad de la gestación de la burra comparada con la de la yegua. En la burra se desarrollaron copas endometriales anchas y activas que secretaron altas concentraciones de eCG, lo que a su vez resultó en un marcado aumento en las concentraciones de progesterona y en el desarrollo de varios cuerpos lúteos secundarios después del día 40 postovulación. En cambio, en la yegua receptora apenas se detectó una muy pequeña elevación en la secreción de eCG entre el día 43 y 51 de la gestación y no se formaron cuerpos lúteos secundarios, por lo que no se encontró una elevación en las

concentraciones de progesterona después del día 40 de la gestación. A pesar de las diferencias hormonales, las dos gestaciones continuaron hasta el nacimiento de dos gemelos vivos idénticos, lo que demuestra que la marcada elevación en las concentraciones de eCG y progesterona que se producen normalmente a partir del segundo mes de la gestación equina no es indispensable para que dicha gestación llegue a término (Allen et al., 1993a; Allen et al, 1987).

Un segundo modelo experimental es la transferencia xenogénica de embriones de burro al útero de yeguas. En estas gestaciones el cinturón coriónico se desarrolla muy pobremente, por lo que hay una deficiente invasión y proliferación de las copas endometriales en el endometrio a partir del día 36. Adicionalmente, las copas endometriales del embrión burro son rechazadas muy rápidamente por el sistema de inmunidad celular de la madre. Como resultado de la ausencia de eCG en la sangre materna no se desarrollan cuerpos lúteos secundarios y la gestación se mantiene únicamente por la presencia y función continua del cuerpo lúteo primario. Además del rechazo prematuro de las copas endometriales, en la gestación experimental de embrión burro en yegua se producen otros defectos en la placentación, ya que el corioalantoides del embrión burro y el endometrio equino permanecen en estrecho contacto, pero no se desarrolla una adecuada interdigitación entre las vellosidades corioalantoideas y las criptas endometriales. A pesar de lo anterior, en este modelo el embrión continúa desarrollándose normalmente hasta el día 60-65 de la gestación. Posteriormente, debido a los problemas en la formación de la placenta el estado nutricional del feto se deteriora, por lo que va adquiriendo una apariencia caquéctica y el líquido amniótico se torna achocolatado debido a la hemólisis de los glóbulos rojos fetales provocada por el paso de linfocitos maternos a la circulación fetal a través de la placenta dañada. Finalmente entre el día 85 y 100 de la gestación se produce el aborto del feto muerto y degenerado una vez que las concentraciones de progesterona disminuyen a niveles basales, permitiendo que el cérvix se relaje y el producto sea expulsado (Allen, 2001c; Allen et al., 1987). Los resultados de este modelo sugieren que la eventual muerte de un embrión burro transferido al útero

de una yegua se debe finalmente al daño físico a la placenta, y no a una deficiencia endocrina.

Todo lo anterior significa que la eCG no parece ser indispensable para el mantenimiento de la gestación equina. Sin embargo, podría tratarse de una hormona “redundante” con respecto a la LH, aparecida como consecuencia de una cuidadosa adaptación evolutiva con el objeto de garantizar el éxito de la gestación en situaciones de riesgo anormal, como el que podría ocurrir si se presenta una deficiente secreción de LH hipofisaria o si se produce una secreción endógena de prostaglandina F₂ α que podría destruir un cuerpo lúteo que no se encuentre protegido por los efectos luteotrópicos de la eCG (Allen, 1984; Allen, 2001b).

4.3.4 Regulación de la Secreción de eCG

Los factores que regulan la secreción de eCG por parte de las copas endometriales son aun desconocidos. En las células de las copas endometriales no se han identificado gránulos de secreción similares a los que se encuentran en los gonadotropos. Además, el patrón de secreción de eCG no es pulsátil como en el caso de las gonadotropinas hipofisarias, sugiriendo que la eCG se secreta en forma constante y no regulada conforme va siendo producida, sin pasar por un paso de almacenamiento temporal en gránulos de secreción (Roser, 1999).

Theingi et al. (2002) informaron que el factor de crecimiento epidermal (EGF) regula la síntesis de la subunidad α de la eCG a través de la Kinasa de proteínas C (PKC), la cual activa a la MAP kinasa (MAPK). El EGF se puede encontrar en el corioalantoides desde el día 30 hasta el día 150 de la gestación, que justamente corresponde al periodo de actividad de las copas endometriales. Al parecer el EGF juega un papel fundamental en el desarrollo de la implantación (Theingi et al., 2002).

Existen factores que indirectamente afectan la secreción de la eCG, como son la raza de la madre y del padre del embrión, el tamaño corporal de la madre, y la presencia de gestaciones gemelares. Se ha informado que las yeguas de razas pesadas tienen menores concentraciones de eCG que las yeguas de razas ligeras. Este efecto se ha atribuido a la dilución de la hormona en grandes

volúmenes de líquidos corporales, aunque la hipótesis no ha sido confirmada. Las burras tienen mayores concentraciones de gonadotropina coriónica que las yeguas. En cuanto a las gestaciones gemelares, las yeguas que tienen gemelos bilaterales secretan mayor cantidad de eCG debido a que se forman dos cinturones coriónicos y por lo tanto se desarrolla una mayor cantidad de copas endometriales. También se ha sugerido que el sexo fetal influye en la secreción de eCG, aunque este efecto tampoco se ha confirmado (Allen et al, 1973; Roser et al, 1984).

El cuerpo lúteo primario expresa un menor número de receptores para eLH/CG durante la gestación avanzada que en gestaciones tempranas, lo que resulta en una reducción gradual de la función lútea después del día 80 de la gestación. Sin embargo, ésta no sufre por falta de progesterona, ya que conforme se reduce la producción de progesterona por parte del cuerpo lúteo se incrementa la producción de progestágenos por la placenta, hasta que ésta última permanece como la única fuente de dichas hormonas durante el resto de la gestación (Saint-Dizier et al., 2003).

Por otra parte, las gónadas fetales del equino son muy activas, y se ha demostrado que expresan receptores para eLH/CG, lo que sugiere que una de las funciones de la eCG puede ser la de estimular la maduración y/o función de las gónadas fetales (Saint-Dizier et al., 2003).

La muerte del feto después del día 35 de la gestación no afecta la secreción de eCG ni la vida normal de las copas endometriales, lo que sugiere que las copas endometriales están programadas para funcionar en forma autónoma y que la gestación por si misma no juega un papel regulador en la secreción de eCG (Allen et al., 1993a).

4.3.5 Papel de la eCG Durante la Gestación Equina

Tradicionalmente se ha considerado que la eCG producida por las copas endometriales es la hormona responsable de inducir la formación de cuerpos lúteos accesorios durante la gestación equina, así como de estimular la función tanto del cuerpo lúteo primario como de los accesorios. Esta función está

respaldada por la estrecha relación que se ha encontrado entre los perfiles de secreción de eCG y los de progesterona a lo largo de la primera mitad de la gestación. Al inicio de la gestación equina las concentraciones de progesterona en plasma alcanzan un máximo de 8 a 15 ng/ml entre los días 6 y 14 post ovulación, declinando a 4 o 6 ng/ml entre los días 30 y 35 de la gestación. A partir del día 35 las concentraciones de progesterona se vuelven a elevar debido tanto a la resurgencia del cuerpo lúteo primario como a la formación de cuerpos lúteos accesorios, ambos fenómenos debidos al estímulo luteotrópico de la eCG. El cuerpo lúteo primario es la principal fuente de progesterona durante los primeros 50 días de la gestación, y continúa contribuyendo con su secreción hasta los 120-150 días de gestación. Por otra parte, los cuerpos lúteos accesorios pueden formarse en cualquier momento entre los 40 y los 150 días de gestación. Una vez que se han formado cuerpos lúteos secundarios, y bajo el estímulo continuo de la eCG, se alcanzan niveles de progesterona de hasta 25 ng/ml o más, que se reducen paulatinamente entre el día 100 y el 150 de la gestación conforme el cuerpo lúteo primario y los accesorios comienzan a regresar debido a la desaparición de la fuente de eCG (Murphy y Martinuk, 1991).

Además de la secreción de progesterona, los cuerpos lúteos de la gestación secretan otros progestágenos, como la 5-alfa pregnano 3-20 diona (5 α DHP) y 3 beta 5 pregnona, cuyos incrementos son paralelos a los de progesterona durante la gestación temprana. La eCG no solamente estimula la secreción de progestágenos, sino que es un importante regulador general de la esteroidogénesis lútea, como lo demuestra el hecho de que la administración de dosis altas de eCG entre los días 26 y 28 de la gestación en yeguas preñadas que tenían un cuerpo lúteo funcional resultó en un marcado incremento en la secreción tanto de estrógenos como de androstenediona, lo que no ocurrió al administrar eCG a yeguas gestantes carentes de un cuerpo lúteo, en las que la gestación estaba siendo mantenida mediante la administración de progestágenos exógenos. Esto explica el porqué el inicio de la secreción de eCG en yeguas gestantes coincide con un incremento en las concentraciones plasmáticas de estrógenos y

andrógenos asociado con la resurgencia del cuerpo lúteo primario y la elevación en las concentraciones de progesterona (Daels et al., 1998).

Durante la segunda mitad de la gestación desaparecen todos los cuerpos lúteos y la única fuente de progesterona la constituye la placenta, lo que resulta en bajos niveles (≤ 4 ng/ml) de progesterona circulante en la sangre materna debido a que la mayor parte de la hormona se transforma en otros metabolitos antes de pasar a la circulación materna. Las concentraciones maternas de progesterona solo vuelven a elevarse entre 30 y 50 días antes del parto debido a cambios en el metabolismo placentario de los progestágenos, que ahora permite el paso de progesterona sin metabolizar a la circulación materna (Murphy y Martinuk, 1991).

La eCG juega un papel fundamental en la generación de cuerpos lúteos secundarios durante la gestación equina. Durante la época ovulatoria (primavera-verano), mediante determinaciones seriales de FSH hipofisiaria en suero de yeguas que están ciclando y en yeguas gestantes, se ha encontrado que el patrón de liberación de esta hormona hipofisiaria se da con intervalos de 10 a 12 días. Este patrón rítmico de liberación es controlado esencialmente por la longitud del día y por la secreción folicular de inhibina, activina y/o estradiol, pero no está influenciado por la retroalimentación negativa de la progesterona. La liberación de FSH hipofisiaria se mantiene durante los primeros días de la gestación, por lo que el crecimiento de folículos continúa hasta el día 18 al 23 de la gestación. Sin embargo estos folículos no ovulan debido a que la presencia de progesterona proveniente del cuerpo lúteo de la gestación impide la liberación preovulatoria de LH, por lo que tienden a regresar. Diez a doce días después se produce una nueva oleada folicular que coincide con el inicio de secreción de eCG, la cual actúa induciendo la maduración, ovulación y/o luteinización del folículo dominante (Allen et al., 1993a). Sin embargo, no todas las yeguas gestantes forman cuerpos lúteos secundarios, y en aquellas en las que sí se forman existe mucha variabilidad en cuanto a su número y día de formación, lo que sugiere que no se trata de un proceso esencial para el mantenimiento de la gestación. Por lo tanto, la formación de cuerpos lúteos secundarios, y por lo tanto la secreción de eCG, podrían considerarse como mecanismos de seguridad que, sin ser esenciales

para la gestación podrían aumentar la probabilidad de éxito de la misma (Allen, 1984; Daels et al., 1998).

En las yeguas que conciben al final de la época reproductiva los primeros meses de gestación transcurren durante el periodo de días cortos que corresponde con el periodo de inactividad ovárica. Estas yeguas tienen concentraciones normales de eCG, pero posiblemente tienen menor secreción de FSH, por lo que generalmente tienen menos ovulaciones secundarias que las que se presentan en yeguas en las que la gestación transcurre en plena época ovulatoria (Allen, 1984).

El número de cuerpos lúteos que se desarrollan en gestaciones que comienzan al inicio de la época ovulatoria (primavera) es mayor que el de los que se desarrollan al final de la temporada reproductiva (verano) (Allen, 1984).

Durante los primeros 40 días de la gestación el cuerpo lúteo primario es mantenido por la LH hipofisiaria, mientras que en etapas posteriores es estimulado por la eCG. Sin embargo, en la yegua el CL primario tiene la capacidad de mantenerse sin apoyo de eCG hasta por 80 días después de haber ocurrido el reconocimiento de gestación con o sin presencia de un producto vivo (Allen, 2001a). Adicionalmente, se ha demostrado que la LH hipofisiaria puede, por si misma, mantener la función del cuerpo lúteo primario sin necesidad de eCG. Así, en yeguas a las que se les ha transferido un embrión burro, y que por lo tanto no producen eCG, el cuerpo lúteo primario se mantiene funcionando durante los primeros 3 meses de la gestación, pero regresa rápidamente si a dichas yeguas se les inhibe la secreción de LH hipofisiaria mediante la administración de un progestágeno sintético (Allyl trenbolone) que provoca retroalimentación negativa sobre la secreción hipofisiaria de LH (Allen et al., 1987). Se ha comprobado que la vida funcional del cuerpo lúteo en yeguas histerectomizadas varía entre 70 y 140 días, mientras que en yeguas gestantes persiste hasta más allá del día 140. Squires et al. (1975) encontraron que el cuerpo lúteo primario puede permanecer en el ovario hasta los días 160-180 de la gestación; mientras que la producción de progesterona por lo menos llega hasta el día 180 de la gestación (Squires y Ginther, 1975). También se ha visto que la remoción de los ovarios entre los días

50 y 70 de la gestación ocasiona la pérdida fetal o el aborto en muchas yeguas, pero no en todas (Bergfelt et al., 1989).

La eCG es requerida para un desarrollo normal de los cuerpos lúteos secundarios, sin embargo se ha visto que la gestación puede ser mantenida por varias semanas y aún continuar hasta su término sin la presencia de eCG y cuerpos lúteos secundarios. La progesterona producida por los cuerpos lúteos secundarios no es indispensable para el mantenimiento de la gestación, simplemente los cuerpos lúteos secundarios permiten asegurar una fuente extra de progesterona en caso de una regresión prematura del cuerpo lúteo primario (Allen, 2001a).

4.4 PLACENTACIÓN EQUINA

La placentación en equinos es de tipo central, difuso, epiteliocorial y no invasiva, aunque las células que conforman el cinturón corionico si invaden el endometrio materno. Tanto los embriones equinos como los de burro son capaces de producir estrógenos antes de la implantación. Los embriones equinos expresan la enzima aromatasa desde el día 5 o 6 de la gestación. La distribución de la aromatasa en las membranas placentarias antes de la implantación en los embriones equinos y de burro es diferente. En el embrión de burro la actividad de la aromatasa es similar en todos los tejidos embrionarios analizados (saco vitelino, cinturón corionico y corioalantoides) mientras que en el embrión equino la actividad de la aromatasa es mayor en el cinturón coriónico, intermedia en el saco vitelino y menor en el corioalantoides) (Heap et al., 1991).

A partir del día 40, una vez que ha comenzado la invasión del endometrio materno por parte de las células del cinturón coriónico, comienza una interacción entre las células del endometrio materno y las células no invasivas del corioalantoides equino, que incluye la formación de microvellosidades tanto del lado materno como del lado fetal. En la interfase materno-fetal se proyectan microvellosidades del coriolantoides en forma de dedos, que se ramifican y se alargan hacia la superficie del endometrio, en la cual también se están formando microvellosidades. Para el día 60 los componentes maternos y fetales se han ínter digitado en forma estrecha, formando una extensa ramificación. Tanto las microvellosidades del lado materno como las del lado fetal están profusamente irrigadas por una amplia red capilar, por lo que hacia el día 120 de la gestación se forman verdaderos microplacentomas en toda la superficie de la placenta con microcotiledones del lado embrionario y microcarúnculas del lado materno, lo que permite un extenso intercambio de gases, nutrientes y desechos entre la circulación materna y la circulación fetal (nutrición hemotrófica) (Heap et al., 1991). Por otra parte, las glándulas endometriales y sus largas ramificaciones permanecen funcionales a lo largo de la gestación, liberando sus secreciones ricas en proteínas hacia espacios definidos llamados areolas, que se localizan entre microplacentomas contiguos. El tejido corioalantoideo que descansa sobre las

aperturas de las glándulas endometriales se comienza a pseudo estratificar para poder absorber las secreciones de las glándulas uterinas. Esta forma histotrófica de nutrición del embrión equino sin duda complementa a la nutrición hemotrófica para satisfacer las demandas impuestas por el rápido crecimiento del producto, especialmente en los primeros 2 meses de la gestación (Allen y Stewart, 2001).

Para que se lleve a cabo con éxito una gestación es necesaria la presencia de una placenta microcotiledonaria saludable y bien desarrollada en estrecho contacto con un endometrio saludable y plenamente funcional. Una disminución en la vasta área de contacto materno-fetal puede causar muerte embrionaria temprana o abortos, o resultar en el nacimiento de potros débiles y con pocas posibilidades de sobrevivir (Allen y Stewart, 2001).

Alrededor del día 80 de la gestación las gónadas fetales tanto de los fetos machos como de las hembras, comienzan a crecer paulatinamente hasta que alcanzan una talla y peso máximo de 350 gramos entre los 230 y 260 días de la gestación. Durante esta etapa las gónadas equinas ocupan la tercera parte del volumen total de la cavidad abdominal del feto, adquiriendo una apariencia física de riñón más que de gónada. El aumento de tamaño de las gónadas fetales hacia la mitad de la gestación está acompañado por una proliferación de células intersticiales, las cuales durante este periodo producen grandes cantidades de esteroides. La hipófisis fetal durante la gestación temprana (antes del día 100) tiene una gran actividad gonadotrófica que apoya el crecimiento y la esteroidogénesis de las gónadas fetales (Pashen y Allen, 1979).

4.5 MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LA FALLA DE LA GESTACIÓN EQUINA

4.5.1 Xenogestación

Un modelo de gestación fallida en la cual ocurre un alto porcentaje de muerte fetal espontánea en un momento predecible de la gestación es el obtenido mediante la transferencia extraespecífica de embriones burro a yeguas (xenogestación). En dicho modelo más del 80% de los fetos mueren y son abortados entre los 80 y 100 días de la gestación debido a una implantación anormal acompañada por una intensa acumulación de leucocitos en el endometrio de la yegua (Allen et al., 1987). Además, en este tipo de gestación el cinturón corionico del embrión burro falla completamente en su intento de invadir el endometrio de la yegua hacia el día 36 de la gestación, y por lo tanto no se llegan a formar las copas endometriales y no hay producción de eCG, a pesar de lo cual el embrión de burro continúa creciendo normalmente durante los siguientes 25-30 días (Allen, 1982). El corioalantoides del embrión burro se expande por todo el endometrio de la yegua, aunque la adhesión entre ambos es mínima ya que no existe una unión estrecha entre las microvellosidades del feto y las de la superficie endometrial, por lo que no se forman los microplacentomas característicos de la gestación equina. Finalmente, entre el día 65 y 80 de la gestación el feto llega a debilitarse adquiriendo una apariencia congestionada, mientras que el fluido amniótico asume una apariencia de color achocolatada debido a la hemólisis de los glóbulos rojos del feto. Durante el mismo periodo se incrementa el número de linfocitos y otros leucocitos que se congregan en el estroma subepitelial del endometrio. También se observa gran cantidad de material exocrino secretado tanto por las glándulas endometriales como por las células trofoblásticas. Dicho material se acumula entre el epitelio endometrial y el corioalantoides, interfiriendo con el proceso normal de adhesión e implantación. En la mayoría de los casos, entre el día 80 y 95 de la gestación xenogénica los linfocitos acumulados comienzan a pasar a través del epitelio endometrial, activando un ataque inmunológico al trofoblasto del burro. Esto finalmente provoca el aborto de un feto pálido y una placenta con cambios autolíticos, así como la caída en las concentraciones de

progesterona a menos de 1ng/ml, provocando que el cérvix se relaje y la yegua regrese a estro (Allen et al., 1987).

Al parecer la mortalidad fetal y el aborto en las xenogestaciones se deben en parte a la respuesta inmunológica de la madre ante un feto de otra especie, ya que la inmunización pasiva con suero de yeguas que llevan una gestación intraespecífica (feto equino), así como la inmunización activa con linfocitos de burro causan un incremento marcado en el porcentaje de supervivencia de fetos y por lo tanto de nacimientos de burros vivos. Adicionalmente, las xenogestaciones de fetos burros en yeguas que ya hayan tenido gestaciones de burro pueden proveerle una respuesta inmunoprotectiva materna (Allen et al., 1987).

Allen (2001b) ha encontrado que la xenogestación obtenida al transferir embriones de burro a yeguas no siempre resulta en la muerte del producto, a pesar de que las copas endometriales nunca se desarrollan en éste tipo de gestación, por lo que han concluido que la eCG *per se* no es indispensable para mantener la gestación equina, ya que algunas yeguas con este tipo de gestaciones llegan a término a pesar de la completa ausencia de esta hormona y a la falta de formación de cuerpos lúteos secundarios (Allen, 2001b). Por esta razón, se puede postular que la eCG producida por las copas endometriales puede tener efectos redundantes con los de la LH, por lo que la función de la eCG sería la de servir como “seguro” para garantizar la correcta estimulación del cuerpo lúteo (Allen et al., 1987; Allen, 2001b).

En la mayoría de las yeguas que llevan un embrión burro las concentraciones de progesterona permanecen relativamente constantes, alrededor de 3 a 10 ng/ml, disminuyendo lentamente entre los 40 y 80 días de gestación, lo que sugiere que la eCG no es necesaria para mantener la función del cuerpo lúteo primario de la gestación. La ausencia del incremento típico en las concentraciones de progesterona después del día 40 en gestaciones equinas, indica la ausencia de ovulaciones accesorias debido a la falla en la secreción de eCG por parte de las copas endometriales. Sin embargo en algunas yeguas con gestaciones de burro se llega a producir una elevación en las concentraciones de progesterona después del día 40, indicando la formación de cuerpos lúteos accesorios, lo que sugiere que la eCG

tampoco es indispensable para la formación de cuerpos lúteos accesorios durante la gestación equina (Allen, 1982; Allen, 1973; Allen et al., 1987).

4.5.2 Gestación Mular

Otro modelo que se ha utilizado para estudiar el papel de la eCG durante la gestación equina es el de la gestación mular producida por la cruce de una yegua con un burro, modelo que además es relevante en si mismo debido a la importancia económica de la producción de mulas y a la alta incidencia de fallas en este tipo de gestación. En yeguas que llevan gestaciones mulares, la reacción inmunitaria en contra de las copas endometriales se caracteriza desde el principio por una infiltración masiva de linfocitos alrededor de las copas endometriales, lo que interfiere con la formación normal de las mismas y resulta en un rechazo inmunológico prematuro. Por esta razón las concentraciones de eCG durante una gestación mular son mucho menores que las presentes durante una gestación normal equina, lo que resulta en una menor formación de cuerpos lúteos secundarios y en concentraciones de progesterona considerablemente más bajas en la gestación ínter especies (embrión mula) comparada con la yegua con gestaciones intraespecie (embrión equino) (Allen, 1984; Allen, 1982; Allen et al., 1993b; Boeta y Zarco, 2005).



Figura 4.3 Úteros de yeguas con gestaciones mulares de 65 días de edad. Obsérvese el escaso desarrollo de las copas endometriales.

La eficiencia reproductiva obtenida al cruzar yeguas con burros es menor que la obtenida después de la cruce normal de yeguas con caballos. Se ha postulado que una posible causa de esta baja fertilidad es la escasa producción de eCG en las

yeguas con gestación mular debida al desarrollo inadecuado y al rechazo prematuro de las copas endometriales en este tipo de gestación. Boeta y Zarco (2005) encontraron una incidencia significativamente mayor de pérdidas de gestación en yeguas gestantes con embrión mula (36.8 %) que en las gestantes con embrión caballo. Sin embargo, ellos no encontraron relación alguna entre la mortalidad fetal y la falta de eCG, ya que las yeguas que abortaron embriones mula tuvieron niveles de eCG y progesterona semejantes que los de las yeguas que llevaron sus embriones mula a término. Además, confirmaron lo encontrado por Allen et al. (1987) en gestaciones xenogénicas, en el sentido de que muchas yeguas con embrión mula pueden concluir exitosamente su gestación a pesar de tener concentraciones bajas de progesterona y casi inexistentes de eCG (Allen et al., 1987; Boeta y Zarco, 2005).

Al analizar sus resultados, Boeta y Zarco (2005) concluyeron que posiblemente el umbral de progesterona necesario para mantener una gestación en la yegua es considerablemente bajo, por lo que muchas yeguas gestantes con embrión mula pueden mantener su gestación a pesar de que la ausencia de eCG les impida elevar sus concentraciones de progesterona en la forma que ocurre durante la gestación normal de yegua con caballo. También postularon que la eCG podría estar actuando en forma redundante por si la LH hipofisiaria no fuese capaz de estimular en forma adecuada la función del cuerpo lúteo de la gestación, lo que podría ocurrir si la yegua quedase gestante al final de la época reproductiva, ya que en este caso la gestación transcurriría durante un periodo en el que la secreción de LH hipofisiaria está inhibida. Esta hipótesis es apoyada por los hallazgos de Allen et al. (1987), quienes reportaron que en gestaciones xenogénicas carentes de eCG el cuerpo lúteo primario continua funcionando bajo el estímulo de LH hipofisiaria, y que la supresión de la secreción de esta hormona por retroalimentación negativa con progestágenos sintéticos resulta en una pérdida inmediata de la función lútea.

Para evaluar esta hipótesis, en el presente trabajo se compararán los perfiles hormonales y la incidencia de pérdida de gestación en yeguas preñadas con caballo o con burro al inicio o al final de la época reproductiva (Allen et al., 1987; Boeta y Zarco, 2005).

4.6 MÉTODOS PARA EVALUAR LAS CAUSAS DE PÉRDIDA DE LA GESTACIÓN

Debido a que no es posible predecir el momento en que se va a producir una falla de la gestación es necesario realizar un seguimiento periódico de diversas variables a lo largo de la gestación con el objeto de que, una vez que se presente la muerte embrionaria o fetal, se cuente con información que permita evaluar retrospectivamente lo que ocurrió antes, durante y después de detectarse la gestación.

El seguimiento ultrasonográfico permite evaluar el desarrollo de las estructuras embrionarias y determinar la viabilidad del producto, así como determinar el momento aproximado de la muerte del producto. Por otra parte, las determinaciones hormonales seriadas permiten evaluar la función lútea (progesterona), de la unidad feto-placentaria (sulfato de estrona), y de las copas endometriales (eCG). El estudio de las relaciones temporales entre alteraciones hormonales y la muerte del producto pueden dar indicios sobre la posible causa de la pérdida de la gestación (Kindahl et al., 1982; Boeta y Zarco, 2005).

4.6.1 Determinación de Progesterona

La importancia de la progesterona para el mantenimiento de la gestación ha sido bien establecida en todas las especies. Durante la gestación equina se produce un incremento paulatino en las concentraciones de esta hormona a partir de la ovulación, seguido por un declive en el día 20 postovulación, para volver a incrementarse entre el día 35 y 45 de la gestación, llegando a su máximo pico de secreción hacia el día 90 a partir del cual posteriormente decaen para desaparecer de la circulación materna hacia el día 150-180 de la gestación (Allen et al., 1973; [Evans](#) e [Irvine](#), 1975). Durante los primeros dos meses de gestación la fuente de progesterona son los cuerpos lúteos primarios y secundarios. En yeguas ovariectomizadas se ha demostrado que a partir del día 70 de la gestación la placenta empieza a producir cantidades considerables de progestágenos a partir de colesterol obtenido de fuentes maternas. En la segunda mitad de la gestación desaparecen los cuerpos lúteos y la única fuente de progestágenos la constituye

la placenta. En ésta etapa no es posible encontrar progesterona en la circulación materna, pero si metabolitos de progesterona como dihidroprogesterona (5α DHP) y 20α dihydroxy 5 pregnanos (20α 5P) ([Evans e Irvine, 1975](#); [Holtan et al., 1979](#)). Por esta razón las determinaciones de progesterona circulante son útiles para evaluar la función lútea durante la primera mitad de la gestación, pero no para evaluar la función placentaria en la segunda parte de la gestación. Boeta y Zarco (2005) calcularon curvas promedio de progesterona durante los primeros meses de gestación de yeguas servidas con caballo y yeguas servidas con burro, demostrando que en éstas últimas las concentraciones promedio de progesterona son significativamente menores que las de yeguas servidas con caballo a partir del día 49 de la gestación. También compararon las curvas individuales de animales con pérdida de gestación contra las curvas promedio para gestaciones normales del mismo tipo (embrión mula o embrión equino), encontrando patrones que sugieren que en algunos casos la muerte fetal se debió a la ocurrencia de luteólisis activa (Boeta y Zarco, 2005). En cambio, no encontraron evidencia de que la muerte embrionaria o fetal estuviese asociada con una función lútea disminuida debida a falta de apoyo gonadotrópico.

4.6.2 Determinación de Estrógenos

Las concentraciones de estrógenos durante los primeros 30 días de la gestación son similares a los encontrados en yeguas no gestantes (Allen et al., 1973). Sin embargo, el perfil en la secreción de estrógenos en la yegua gestante es único entre las especies domésticas. Se sabe que el embrión equino es capaz de sintetizar estrógenos desde el quinto o séptimo día post-fertilización. Tanto el embrión equino como el de burro tienen la capacidad enzimática de producir cantidades considerables de estrógenos desde antes de que ocurra la implantación. No obstante existen diferencias entre el embrión de caballo y el de burro (Dehennin et al., 2007). La capacidad enzimática de la aromatasa en caballos es más prominente en el cinturón coriónico, en segundo lugar en el saco vitelino y por último en el alantocorion, mientras que en el embrión burro la expresión de la aromatasa es similar en las tres membranas extraembrionarias

(Allen et al., 1973). A pesar de la producción de estrógenos por el embrión, durante las primeras semanas de la gestación la principal fuente de estrógenos circulantes en la yegua son sus ovarios (Allen et al., 1993^a; Allen et al., 1973; Heap et al., 1991). El incremento en la secreción de estrógenos que se observa entre el día 35 y 50 de la gestación no se origina en folículos ováricos sino en el cuerpo lúteo de la gestación, siendo su producción fuertemente estimulada por la eCG. La eCG estimula la síntesis de estrógenos por parte tanto del cuerpo lúteo primario como de los secundarios. Se ha sugerido que el papel de los estrógenos lúteos es apoyar de manera autocrina la producción de progesterona (Daels et al., 1990; Daels et al., 1998).

Desde el día 80 de la gestación las gónadas fetales comienzan a secretar cantidades significativas de dehidroepiandrosterona (DHEA), la cual es aromatizada en la placenta y aparece en la circulación materna como estrógenos conjugados (sulfato de estrona) y en menor medida como estradiol 17- β (Albrecht et al., 1997; Terqui y Palmer, 1979). El hígado fetal también participa transformando parte de los andrógenos producidos en la gónada en substratos aromatizables para la placenta (Saint-Dizier et al., 2004; Strauss et al., 1996). La producción de sulfato de estrona en la yegua gestante es dependiente tanto de la presencia de un feto viable que produzca cantidades normales de DHEA, como de la presencia de una placenta funcional con capacidad de aromatización normal. Hacia el día 100 de la gestación las concentraciones de sulfato de estrona son \geq 30ng/ml, lo que representa valores 10 veces más grandes que las concentraciones más altas encontradas en yeguas no gestantes. Se ha demostrado que la inducción del aborto en la yegua es seguida por una muy rápida caída en las concentraciones circulantes de sulfato de estrona ([Henderson](#) et al., 1998).

Tanto los testículos como los ovarios fetales comienzan a agrandarse alrededor del día 80 de la gestación, alcanzando su tamaño máximo alrededor del día 240, cuando ocupan mas de la mitad del volumen total del abdomen fetal, siendo más grandes que los propios ovarios de la yegua. Tanto en fetos machos como en hembras, el crecimiento de las gónadas es acompañado por hipertrofia masiva e hiperplasia de las células intersticiales, regresando a sus proporciones y

morfologías normales alrededor del día 336-340, cuando ocurre el parto. Estudios ultra estructurales han demostrado que estas células poseen organelos normales asociados con la biosíntesis de esteroides. Se ha demostrado que los testículos fetales tienen la capacidad de sintetizar dehydroepiandrosterona (DHEA) *de novo* a partir de acetato. Por otra parte, la placenta equina tiene la capacidad de sintetizar tanto 17- β estradiol como estrona a partir de los precursores androgénicos. Las concentraciones de andrógenos secretados por las gónadas fetales alcanzan niveles de hasta 400 ng/ml entre los 190 y 250 días de gestación para declinar al término de la gestación. Después del día 70 de la gestación la unidad feto-placentaria es la principal fuente de estrógenos y esto se demuestra con el incremento en las concentraciones de sulfato de estrona alrededor del día 200-240 de la gestación.

En esta etapa de la gestación estos estrógenos de origen placentario incluyen estrógenos fenólicos como la estrona y el 17- β estradiol, así como estrógenos insaturados en el anillo B como la equilina y equilenina, los cuales son sintetizados por la aromatización de la dihidroandrosteniona (DHA) y la dihidroepiandrosterona (DHEA) por parte de la placenta, así como precursores C-19 sintetizados por las células intersticiales de las gónadas fetales (Pashen y Allen, 1979; Strauss et al., 1996; [Henderson](#) et al., 1998).

La determinación de sulfato de estrona en plasma y orina ha sido utilizada tanto para diagnosticar la gestación en yeguas después de los 70 días de gestación como para monitorear la viabilidad fetal (Terqui y Palmer, 1979; Madej y Kindahl, 1987). Los niveles de sulfato de estrona pueden incrementarse significativamente en algunas yeguas desde el día 40 días postmonta, aunque lo más común es que pueda detectarse a partir de los 60 días. Las yeguas gestantes tienen concentraciones séricas de más de 80 ng/ml de sulfato de estrona. (Henderson et al., 1999).

El mantenimiento de niveles altos y sostenidos de ésta hormona indica en forma confiable la integridad y bienestar de la unidad feto placentaria. Cuando las concentraciones de sulfato de estrona caen abruptamente son evidencia de muerte fetal. Al realizar estudios de mortalidad fetal las concentraciones de sulfato

de estrona pueden dar información de utilidad. Por ejemplo, las concentraciones más bajas de lo normal días o semanas antes de la muerte del producto podrían indicar la presencia de un daño en la unidad feto-placentaria, mientras que el mantenimiento de concentraciones normales hasta el momento de la pérdida de la gestación puede indicar la muerte repentina del producto o su expulsión como resultado de un proceso luteolítico (Terqui y Palmer, 1979; Madej y Kindahl, 1987).

Los estrógenos secretados por la unidad feto-placentaria durante la gestación equina juegan un papel muy importante en el establecimiento de una correcta irrigación en el útero y la placenta, así como para la síntesis y almacenamiento de precursores de prostaglandinas en el endometrio y miometrio. Cuando se realizó la gonadectomía bilateral en fetos equinos entre el día 197 y 253 de la gestación las concentraciones de estrógenos cayeron dramáticamente y los neonatos nacieron débiles y con pobre desarrollo muscular; el parto se presentó espontáneamente 70 a 97 días después de la gonadectomía, y cursó con contracciones miometriales débiles y concentraciones de PGF 2α más bajas de lo normal en la circulación materna, además de presentar retención placentaria (Pashen y Allen, 1979).

4.6.3 Seguimiento Ultrasonográfico

La mortalidad embrionaria temprana se diagnóstica cuando una vesícula embrionaria que se había observado previamente no se encuentra después de dos revisiones ultrasonográficas o cuando solo existen remanentes de la vesícula previamente observada (Ball, 1993; Vanderwall y Newcombe, 2007). El criterio a seguir para diagnosticar una inminente muerte embrionaria temprana es encontrar una vesícula con bordes irregulares, así como fluido ecogénico tanto en la vesícula embrionaria como dentro del lumen uterino. Cuando hay MET después del día 30 ya no se encuentra latido cardíaco en el producto, se observa una pobre definición de las estructuras fetales, los fluidos fetales son de aspecto hiperecogénico, y el diámetro más grande de la vesícula fetal es considerablemente más pequeño que el promedio establecido para una vesícula

de esa edad gestacional. Por otra parte, cuando una vesícula embrionaria incrementa su tamaño muy lentamente con respecto a lo normal puede estar destinada a sufrir MET (Vanderwall y Newcombe, 2007).

Cuando ocurre muerte embrionaria temprana el saco embrionario se colapsa después de la muerte del producto. Durante la etapa fetal el saco puede permanecer intacto por un largo tiempo, pero aparece un anillo ecogénico dentro de la vesícula, así como una masa flotando dentro del fluido. Posteriormente comienza a decrecer el volumen del fluido de la placenta y se observa una desorganización de las membranas placentarias (Vanderwall y Newcombe, 2007).

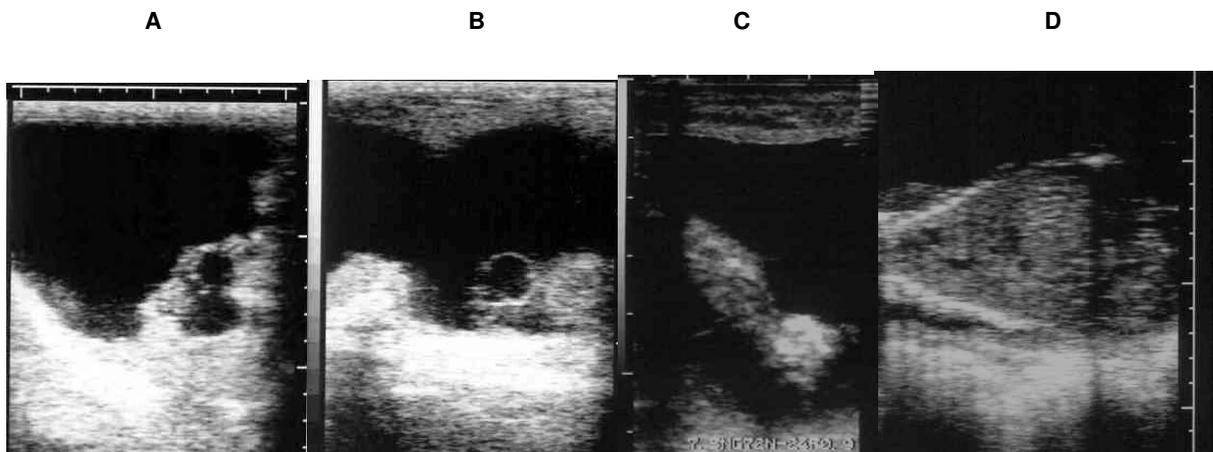


Figura 4.4 Imágenes ultrasonográficas de hallazgos de muerte fetal. En la imagen A y B se observa el anillo ecogénico, mientras que la imagen C muestra un feto con pobre definición de sus estructuras, y en la imagen D se observa la cavidad torácico y abdominal sin una buena definición de las costillas, corazón y estómago fetal.

Ovarian Activity of the Mare During Winter and Spring at a Latitude of 19° 21' North

M. Boeta, MVZ, MS^a A. Porras, MVZ, DCV^a L. A. Zarco, MVZ, PhD^a and R. Aguirre-Hernández, PhD^b

REFEREED

ABSTRACT

The ovulatory activity of mares located at 19° 21' N was monitored from November to June. Twenty-one mares were used (11 quarter-mile mares and 10 hybrids). Every week the mares were subjected to ultrasonographic observations of the ovaries, and blood samples for progesterone determinations were collected. Estrus activity was evaluated by teasing with a stallion. A mare was considered to be in an anovulatory state if progesterone concentrations during 5 or more consecutive samples were below 1 ng/mL. Cyclic ovulatory activity during the entire duration of the study was recorded in 62% of the mares. Only 38% of the mares (5 quarter-mile and 3 hybrid mares) had anovulatory periods, which lasted 128.5 ± 14.4 days (mean \pm SEM) and occurred at some point between November and May. The duration of the anovulatory period varied from 70 to 196 days. Estrous behavior was shown during the anovulatory period in 75% (6/8) of the mares that had such a period. Most mares maintain regular ovulatory activity during the winter and spring at 19° 21' north, and that a wide variation occurs in the duration of the anovulatory period of those mares that stop cycling at this latitude.

INTRODUCTION

The mare is a seasonally polyestrous species that normally ovulates during the months of spring and

summer.^{1,2} Photoperiod is the most important regulator of this seasonal reproductive pattern. The short day length characteristic of fall and winter in regions located at high latitudes causes an increase in the daily duration of melatonin secretion, and this results in decreased secretion of GnRH and the cessation of ovulatory activity.^{1,2} In those regions, during the anovulatory season, most of the mares maintain progesterone concentrations below 1 ng/mL, do not show estrus signs, and have ovaries that are small and smooth, with follicles smaller than 15 mm in diameter.^{3,4}

Limited information is available about the seasonality of ovarian activity of the mare at latitudes closer to the Equator. In Mexico, Gonzalez and Valencia (1977)⁵ studied the annual distribution of estrus in mares located in Mexico City (19° 27' N), finding a very low incidence of estrus during January (2.1%) and February (1.4%).⁵ Saltiel et al (1982)⁶ studied the ovaries of mares killed at slaughterhouse that processed animals of different breeds and ages that arrived from different Mexican states located between 15° and 22° N. They found that from November to February the proportion of animals with either corpora lutea or large follicles was significantly lower than from March to October. Those authors concluded that seasonal reproduction is present in mares kept at these latitudes.⁶

However, no studies have been carried out at the latitude of Mexico in which the ovarian activity of mares has been followed using progesterone determinations and ultrasound observations during the months with reduced ovulatory activity. Thus, whether all mares go through a period of ovarian inactivity is unknown. Neither is any reliable information available about the length of such a period, nor about the time of the year at which it starts and ends. The object of this study was to characterize the ovarian activity of mares in Mexico City (19° 21' NL) during the months of November through June.

From the Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,^a and Coordinación del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Facultad de Medicina,^b Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria 04510, México D.F.

Reprint requests: Myriam Boeta, Puno 945 Colonia Lindavista CP, 07300, Mexico City, Mexico.

0737-0806/\$ - see front matter

©2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Doi:10.1016/j.jevs.2005.12.003

Table 1 Classification of mares according to breed and ovarian activity

	Continuous	Seasonal	Total
Quarter-mile mares	6 (55%)	5 (45%)	11 (100%)
Hybrid mares	7 (70%)	3 (30%)	10 (100%)
Total	13 (62%)	8 (38%)	21 (100%)

The proportion of seasonal mares was not different between breeds ($P > .05$).

MATERIAL AND METHODS

The study was carried out in Mexico City, which is located at 19° 21' N, 2,240 meters above sea level. The difference between the longest and the shortest day of the year is 2 hours 15 minutes.⁷ A total of 21 nonpregnant mares without foals were used: 11 of them were quarter-mile and 10 were hybrids. The animals were fed oat hay, alfalfa hay, and a commercial concentrate.

Blood samples were taken every week from each mare by jugular vein puncture from the first week of November until the first week of June. The samples were centrifuged within the first hour after their collection to separate the plasma, which was kept frozen at -20°C until assayed for progesterone using a solid-phase radioimmunoassay.⁸ Luteal activity was assumed when the concentrations of progesterone were above 1 ng/mL. A mare was considered going through an anovulatory period when progesterone concentrations were below 1 ng/mL on at least 5 consecutive samples.⁹ Persistence of a corpora lutea (CL) was assumed when progesterone concentrations were constantly above 1 ng/mL in 4 or more consecutive samples.¹⁰

From November to April, the mares were teased to check for sexual receptivity, and the ovaries were evaluated weekly by transrectal ultrasonography (Sonovet ultrasound with 5-Mhz linear transducer). Each time, the presence or absence of a CL was recorded. If there was not a CL, the diameter of the largest follicle was measured. The follicles thus recorded were classified as small (<15 mm), medium (16-30 mm), or large (>30 mm).³ All proportions were compared using Fisher's exact test.

RESULTS

Table 1 shows that, according to progesterone profiles, 62% of the mares had continuous ovulatory cycles from November through April (continuous mares), whereas 38% showed a period of ovulatory inactivity (seasonal mares). The proportion of continuous mares was slightly higher in hybrid mares than in quarter-mile mares, but the difference was not significant ($P > .05$). Therefore, breed was not considered in all further analyses.

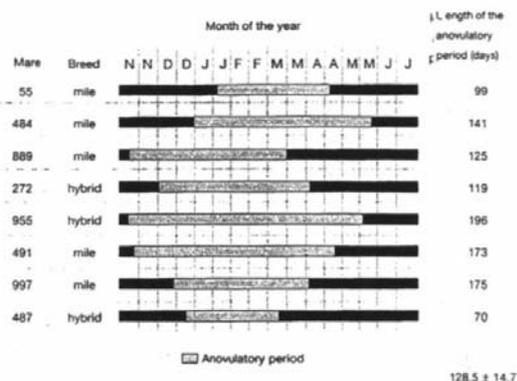


Figure 1. Anovulatory period of mares that showed reproductive seasonality.

In the seasonal mares, the anovulatory period lasted on average 128.5 ± 14.4 days (mean ± SEM). The duration of this period varied from 70 to 196 days in individual animals (Fig 1). Ovarian inactivity started between November and January, and ended between March and May. In 70% of the mares with ovarian inactivity, estrous behavior was intermittently expressed without being accompanied by ovulation (Fig 2).

As shown in Figure 3, the continuous mares had an ultrasonographically detectable CL between 50% and 70% of the times they were evaluated, irrespective of the month. In contrast, the proportion of observations in which a CL was detected was always lower in seasonal mares, reaching its minimum during the months of February and March. The distribution was different between groups ($P < .05$).

When only the observations in which a CL was not present were considered, the distribution of follicles according to size differed between continuous and seasonal mares (Fig 4). In the seasonal mares, the largest follicle present was in most cases a small one, especially in January and February, when there were almost no large follicles. In contrast, most of the continuous mares had large follicles when a CL was not present. The size distribution was different between groups during December, January, and February ($P > .5$).

DISCUSSION

Since the 1930s, the ovulatory period of the mare in northern countries was reported to occur during the months of spring and summer; however, little information is available regarding reproductive seasonality in

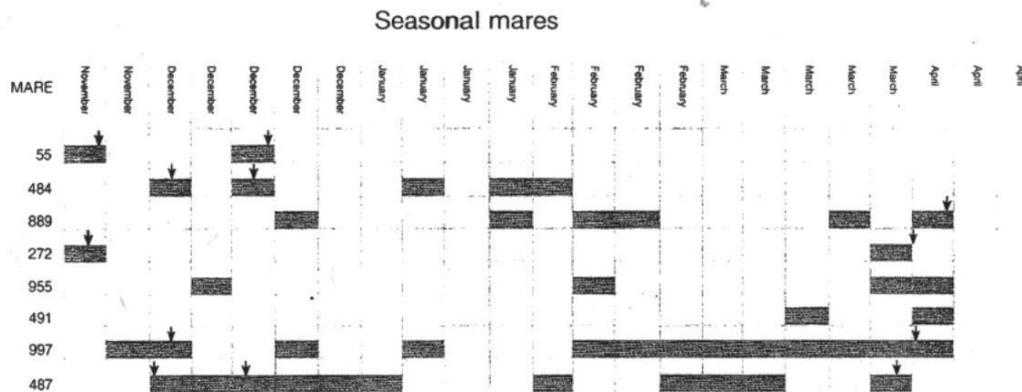


Figure 2. Estrus and ovulatory activity in mares that showed seasonal ovarian activity. Shaded areas represent periods of behavioral estrus. Arrows indicate the occurrence of ovulation as determined by ultrasonography and progesterone profiles.

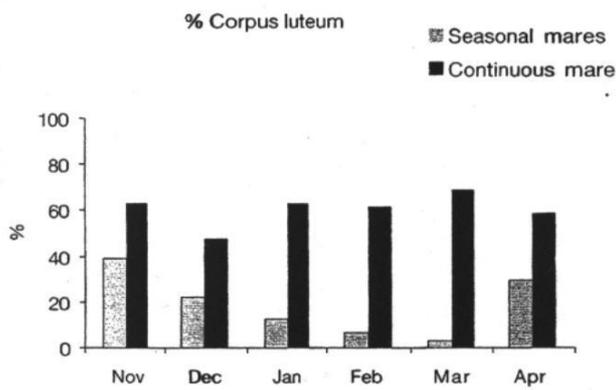


Figure 3. Percentage of observations in which a corpora lutea was detected by ultrasonography in continuous or seasonal mares in different months.

regions closer to the equator. In Mexico, some indirect studies had suggested that a reduction in ovarian activity does occur during the winter,^{5,6} but the current study is the first in which progesterone profiles and ultrasonographic evaluations were used to directly assess changes in ovarian activity in mares located at 19°N. Using these techniques, it was evident that, although there was a reduction in ovarian activity between November and June, more than 60% of the mares continued ovulating throughout this period. This proportion of mares with continuous ovarian activity is much higher than that reported at higher latitudes. For example, Koskinen et al¹⁰ in a study made in Finland (61°N)

found that only 22% of the mares had cyclic secretion of progesterone during the winter.

In our study only 38% of the mares showed a true anovulatory period between the months of November to May. The average duration of the anovulatory period was 128.5 ± 14.4 days; however, its length varied dramatically between mares (70-196 days). In northern latitudes, mares usually have anovulatory periods of up to 6 months' duration.¹⁻³ Ginther (1990)³ reported that the average length of the inactive ovarian period in mares was 150 days, slightly higher than what was found in the current study.

Six of the eight mares that had an anovulatory period showed estrous behavior during the same period. In the absence of progesterone, the mare can show estrous signs without high levels of estrogens, because even ovariectomized mares show estrous at irregular intervals.¹¹ Thus, estrous activity by itself is not a reliable indicator of ovarian activity, as assumed in previous studies carried out in Mexico.⁵

As expected, the mares that were continuously cyclic had a CL on the ovaries approximately 60% of the time (Fig 3). When a CL was not present in the mares of this group, there was usually a large follicle, which is consistent with the preovulatory development that follows CL regression.

In contrast, the absence of a CL in the seasonal mares was usually accompanied mostly by the presence of small or in some cases medium-size follicles (Fig 4), which further supports the notion that their ovarian activity was truly inhibited during this period. Conversely, several studies have shown that mares that maintain cyclic ovulatory activity during seasonal anestrus tend

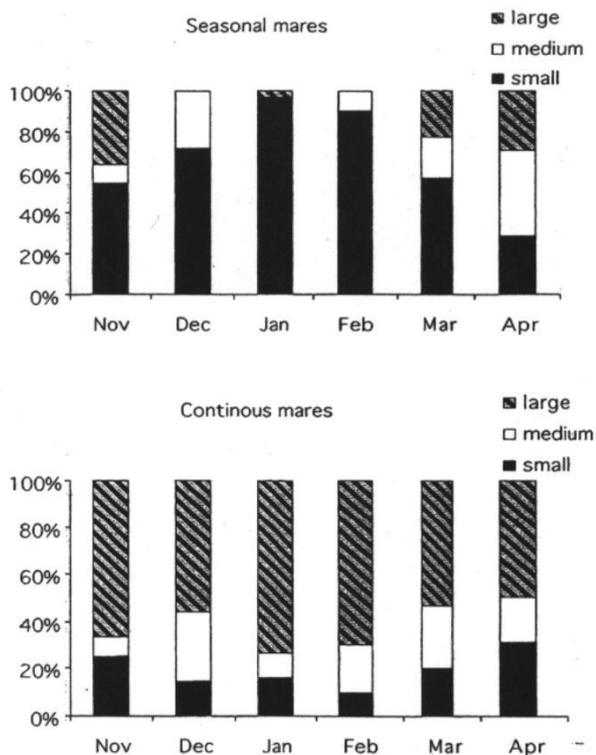


Figure 4. Percentage of observations in which the diameter of the largest follicle present in the absence of a corpora lutea was large (>30 mm), medium (15-30 mm), or small (<15 mm).

to form a persistent CL.^{10,12,13} This was also the case in the current study, in which 30.7% of the mares with continuous ovulatory activity developed at some point or another a persistent CL, which on average remained secreting progesterone for 62 days.

In conclusion, at 19° 21' N, most mares have the ability to continue cycling during the winter months (November-February), even though some mares show a period of ovarian inactivity of variable duration.

REFERENCES

- Palmer E, Guillaume D. Photoperiodism in the equine species: what is a long night? *Anim Reprod Sci* 1992;28:21-30.
- Nagy P, Guillaume D, Daels P. Seasonality in mares. *Anim Reprod Sci* 2000;60-61:245-62.
- Ginther OJ. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. *J Reprod Fertil* 1990;90:311-20.
- Ginther OJ. Occurrence of anestrus, diestrus and ovulation over a 12-month period in mares. *Am J Vet Res* 1974;35:1173-9.
- González AF, Valencia JJ. Estudio del Comportamiento reproductivo de la yegua en México. *Vet Méx* 1977;8:19-21.
- Saltiel A, Calderón A, García N, Hurley, DP. Ovarian activity in the mare between latitude 15° and 22° N. *J Reprod Fert* 1982;32(Suppl.):261-7.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, México: Anuario Estadístico del Distrito Federal, Edición 1997.
- Pulido A, Zarco L, Galina C, et al. Progesterone metabolism during storage of blood samples from Gyr cattle: effects of anticoagulant, time and temperature of incubation. *Theriogenology* 1991;35:965-975.
- Allen WR, Sanderson MW, Greenwood RE, et al. Induction of ovulation in anoestrous mares with a slow-release implant of a GnRH analogue (ICI 118 630) *J Reprod Fert* 1987;35(Suppl.):469-78.
- Koskinen E, Huhtinen M, Katila T. Serum progesterone levels in mares in winter and during transitional periods. *Acta Vet. Scandinavica* 1996;37:409-14.
- Sharp D. Transition into the breeding season: Clues to the mechanisms of seasonality. *Equine Vet J* 1998;20:159-61.
- Allen WR. Practical control of anoestrus in Thoroughbred. In: Ellendorff F, Ellseasser F (eds.). *Endocrine causes of seasonal and lactational anoestrus in farm animals*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1985:98-107.
- King SS, Neumann KR, Nequin LG, et al. Time of onset and ovarian state prior to entry into winter anestrus. *J of Equine Veter Sci* 1993;13:512-5.



EFEREED

Progesterone and Equine Chorionic Gonadotropin Concentrations Around the Time of Pregnancy Loss in Mares Impregnated by Donkeys or Stallions

Myriam Boeta, MVZ, MS, and Luis Zarco, MVZ, PhD

SUMMARY

The objective of this study was to compare the incidence of pregnancy loss of mares carrying a mule embryo with that of mares carrying a horse embryo. The possible causes of such mortality were evaluated through serial ultrasonographic evaluations and hormonal monitoring, paying special attention to the role of premature regression of the endometrial cups and its relation to inadequate luteal function.

Twenty-eight mares impregnated by stallions and 19 mares impregnated with donkey semen were evaluated ultrasonographically every week from day 20 to day 150 pregnancy. The viability of the product was assessed each time, and the diameter of the embryonic vesicle was measured from day 25 to day 60. Blood samples for progesterone and equine chorionic gonadotropin (eCG) determination were taken every week.

Both progesterone and eCG concentrations during normal pregnancies were significantly lower in the mares inseminated with donkey semen than in the mares inseminated by stallions ($P < .05$). In 7 of the mares carrying mule conceptuses to term, the concentrations of eCG remained basal throughout the study. In the other animals from this group, the levels of this hormone did increase but returned to baseline much earlier (on day 77 of pregnancy) than in the mares served by stallions (on day 126

day of pregnancy). There was no significant difference between the growth rate of embryonic vesicles of mares carrying mule embryos and that of mares carrying horse embryos ($P > .05$).

The incidence of pregnancy loss was significantly higher ($P < .05$) in mares carrying a mule embryo (36.8%) than in mares carrying a horse embryo (21.4%); it occurred on average on day 93 of pregnancy in mares carrying mule embryos and on day 43 on mares carrying horse embryos. There was only 1 case in which pregnancy loss was associated with concentrations of both eCG and progesterone that were much lower than the average for the normal pregnancies of the same group, and this was in a mare carrying a horse embryo. The most frequent cause of pregnancy loss was premature luteal regression due to primary luteolysis, as evaluated via peripheral progesterone concentrations. This occurred in 2 mares carrying horse embryos and in 4 mares carrying mule embryos. Three mares carrying mule embryos and 1 carrying a horse embryo had abortions that were not preceded or accompanied by any alteration in progesterone or eCG levels and were thus classified as fetal deaths of non-endocrine origin.

It is concluded that the incidence of pregnancy loss is higher in mares carrying a mule embryo than in mares carrying a horse embryo. However, this is not due to the low progesterone concentrations associated with the premature regression of the endometrial cups that occurs in mares with interspecific pregnancy.

INTRODUCTION

In many developing countries, the mule is still an important source of transport and draft power in such activities as agriculture and mining. Since the mule is an infertile hybrid, replacements are obtained by cross-breeding the domestic horse (*Equus caballus*) with the domestic

From the Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México.

Reprint requests to: Myriam Boeta, Associate Professor, School of Veterinary Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico, D.F. 04510, México.

0377-0806/\$ - see front matter

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.jvevs.2005.10.007

donkey (*Equus asinus*).¹ In practice, this interspecific breeding is usually carried out between mares and jack donkeys and not between stallions and jenny donkeys.

Although scientific information is scarce and old, it appears that the reproductive efficiency obtained by breeding mares with donkeys is lower than that obtained after the normal breeding of mares with stallions.²⁻⁴ A possible cause of this low fertility is the reduced production of eCG in mares carrying a mule pregnancy, which in turn is due to the inadequate development and premature immune rejection of the endometrial cups in this type of animal.⁵⁻⁷

In the ovary of pregnant equids, eCG acts on the equine luteinizing hormone/chorionic gonadotropin (LH/CG) receptor,⁸ inducing the formation of secondary corpora lutea and providing luteotrophic support for the continued function of both primary and secondary corpora.^{5,6} Although the affinity of eCG for the equine LH/CG receptor is only 2% to 3% that of LH,⁸ the circulating concentrations of the placental hormone are much higher than those of LH.⁵ Thus, it is thought that eCG is fully responsible for the increase in progesterone concentrations that occurs after days 35 to 40 of pregnancy.^{5-7,9}

The concentrations of eCG in the blood of mares carrying a mule embryo are much lower, and return to basal levels earlier, than those of mares carrying a horse embryo.^{5,6} This reduced gonadotropic support is associated with low progesterone concentrations, which may result in pregnancy loss.⁹⁻¹⁰

Detailed studies have been done on the immune mechanisms involved in the premature regression of the endometrial cups in mares carrying a mule embryo.^{1,5,11} However, these studies have been carried out in few animals, and little is known about the incidence of the condition or the frequency with which it results in embryo mortality, thus lowering the reproductive efficiency of mares devoted to the production of mules.

The objective of this study is to compare the incidence of pregnancy loss and key gestation hormones in mares carrying a mule embryo with mares carrying a horse embryo. Possible causes of such mortality were evaluated through serial ultrasonographic evaluations and hormonal (eCG and progesterone) monitoring, addressing the hypothesis that premature regression of the endometrial cups would lead to premature loss of luteal function and, hence, embryo loss.

MATERIALS AND METHODS

A total of 47 pregnant mares were used. The control group consisted of 28 mares that were impregnated by natural breeding with a stallion and thus carried a

horse embryo. The experimental group consisted of 19 pregnant mares that had been artificially inseminated with fresh donkey semen diluted in nonfat, ultrapasteurized milk.¹² All pregnancies were confirmed ultrasonographically between day 15 and day 20 post-ovulation, and further examinations of all the mares were carried out every week from day 20 to day 150 post-ovulation or until pregnancy loss was diagnosed. A 5-MHz transducer was used through day 60, and a 3.5-MHz probe was used afterward. Each time, the viability of the product was assessed through heartbeat and fetal movement.¹³ The diameter of the embryonic vesicle, defined as the average of horizontal and vertical diameters, was determined from day 25 to day 60 after ovulation. Starting on day 30, blood samples were taken every week by jugular puncture using Vacutainer tubes with ethylenediaminetetraacetic acid. The samples were centrifuged within the first hour after their collection to separate the plasma, which was kept frozen at -20°C until assayed. Progesterone concentrations were measured by a solid-phase radioimmunoassay.¹⁴ Concentrations of eCG were determined with a commercial enzyme immunoassay.

Endometrial cup regression was considered to have occurred when eCG concentrations returned to nondetectable levels. Luteal regression was defined as the decline in progesterone concentrations to less than 1 ng/mL. Embryonic (before 40 days of pregnancy) or fetal (after day 40) death was registered when neither heart nor fetal movement could be found by ultrasound.^{15,16}

The effect of group (mule embryo or horse embryo) on the mean concentrations of progesterone and eCG for the mares with normal pregnancy (those with no embryonic or fetal death) was compared using an analysis of variance for repeated measures, with group and week as independent variables, and the effect of the animal nested within group.¹⁷ A regression analysis was used to describe the rate of embryonic vesicle growth in the mares with normal pregnancy of each group, and the slopes of the curves were compared between groups. The day of endometrial cup regression in these normal pregnancies was compared between groups by a student *t* test. Fisher exact test was used to compare the number of pregnancy losses between groups.

In each occurrence of pregnancy loss, the weekly concentrations of eCG and progesterone of the mare involved, as well as the growth rate of her embryonic vesicle, were compared against the means of the normal mares in her group. Embryonic or fetal death was classified as non-endocrine in origin when it occurred without any temporally associated alterations in eCG or progesterone.

Table 1 Pregnancy losses in mares carrying horse embryos (control group) or mule embryos (experimental group), classified as embryonic or fetal death

	Control Group n = 28	Experimental Group n = 19
Embryonic death	3 (10.7%)	0
Fetal death	3 (10.7%)	7 (36.8%)
Total pregnancy loss	6 (21.4%) ^a	7 (36.8%) ^b

^{a,b} Significant differences between groups in total pregnancy loss are indicated by different superscripts

erone concentrations.¹⁸ It was considered that pregnancy loss was the result of premature endometrial cup regression when eCG concentrations declined below the average concentrations for normal pregnancies in the group, before or at the same time as the death of the fetus.¹⁹⁻²¹ Continued eCG secretion after the death of the fetus indicated that it had died of causes different from endometrial cup destruction. Primary luteal failure was defined as progesterone concentrations considerably below the average normal levels throughout the study, without actual luteal regression before the death of the fetus.²² Finally, it was considered that the cause of death was premature luteolysis due to prostaglandin secretion when progesterone concentrations declined abruptly around the time of embryonic death, even though the eCG concentrations remained elevated.^{23,24}

RESULTS

Table 1 shows that the incidence of pregnancy losses was significantly higher ($P < .05$) in mares carrying a mule embryo than in mares carrying a horse embryo. The control group suffered both embryonic and fetal losses, occurring on average on day 43 of pregnancy. In contrast, in the experimental group, all the pregnancy losses occurred after day 40 and were thus classified as fetal deaths, occurring on average on day 93 of pregnancy.

Twenty-two mares impregnated by horses and 12 mares impregnated by donkey semen carried out their pregnancies to term and produced viable offspring. Figure 1 shows the average weekly concentrations of progesterone and eCG, considering only these normal pregnancies of each group. Both progesterone and eCG concentrations were significantly lower in the mares inseminated with donkey semen than in the mares impregnated by stallions ($P < .05$).

In 7 of the mares inseminated with donkey semen that carried out their pregnancies to term, the concentrations of eCG remained basal throughout the study (see Fig 2). In the other animals from this group, the levels of

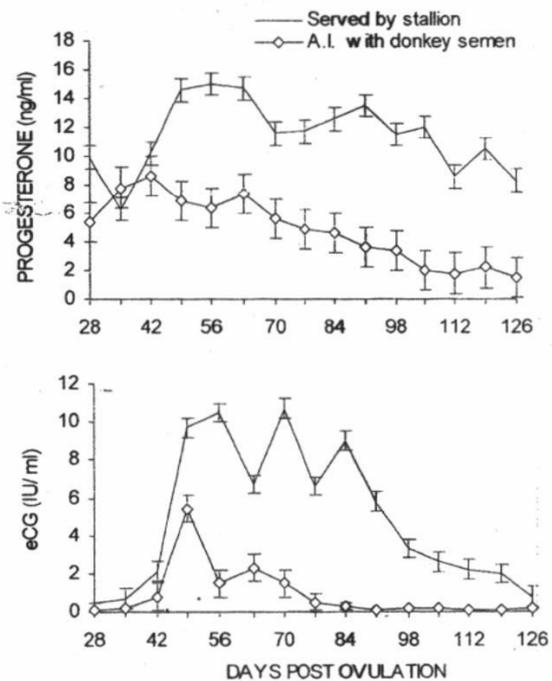


Figure 1. Progesterone and eCG concentrations during normal pregnancies of mares served by stallions ($n = 22$) or inseminated with donkey semen ($n = 12$). Starting on day 49 after ovulation, the mean concentrations of both hormones were significantly higher ($P < .05$) in mares served by stallions than in mares carrying mule embryos.

this hormone did increase but returned to the baseline much earlier (11th week of pregnancy) than in the mares served by stallions (18th week of pregnancy).

As shown in Figure 3, from day 20 to 80 of normal pregnancies, the growth rate of embryonic vesicles of mares carrying a mule embryo was slightly higher (1.41

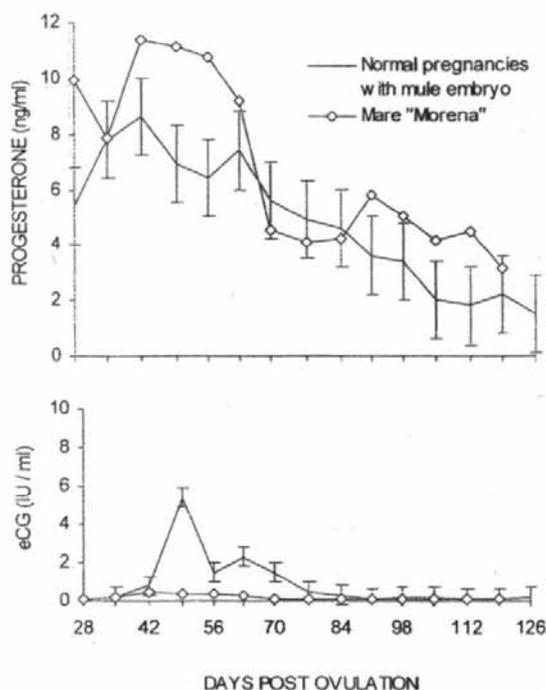


Figure 2. Progesterone and eCG concentrations in a mare (Morena) that successfully carried a mule conceptus to term in spite of a complete lack of eCG. The graph shows the values for this particular mare, contrasted with the mean concentrations for normal pregnancies of mares served by donkeys.

± 0.15 mm/day) than that of mares carrying a horse embryo (1.27 ± 0.13 mm/day). The difference was not significant ($P > .05$).

Table 2 shows the classification of pregnancy losses according to their possible causes. Only 1 case could be attributed to deficient eCG production (secondary luteal insufficiency), and this was in a mare carrying a horse embryo (Fig 4). The concentrations of eCG and progesterone in this mare were always much lower than the average for normal intraspecific pregnancies. However, the same mare later carried out a successful pregnancy, even though it was also associated with low progesterone levels and basal concentrations of eCG (Fig 5).

The most frequent cause of pregnancy loss was premature luteal regression (2 cases in mares served by stal-

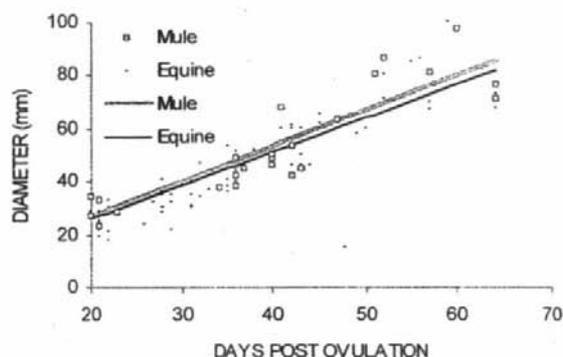


Figure 3. Growth rate of mule or equine embryonic vesicles during normal pregnancies. The marks represent individual measurements, and the lines represent the regression equations of diameter against time.

lions and 4 cases in mares carrying mule embryos). Ultrasonographic and hormonal records of all these cases showed that progesterone concentrations decreased abruptly immediately before the time of pregnancy loss, even though the eCG concentrations were similar to those found during the normal pregnancies of the corresponding group. Thus, these luteal regressions were not likely due to eCG deficiency and were classified as primary luteolysis (see Fig 6).

Three mares carrying a mule embryo and 1 carrying a horse embryo had abortions that were not preceded or accompanied by any alteration in progesterone or eCG levels and were thus classified as fetal death of non-endocrine origin. Finally, 1 mare served by a stallion had an abortion owing to a twin pregnancy. The hormonal and ultrasonographic data from this mare were eliminated from the analysis.

DISCUSSION

In this study, the progesterone and eCG profiles found during normal pregnancy of mares impregnated by a horse (Fig 1) resemble those described by previous authors.^{6,20,21} In these animals, the progesterone concentrations showed a marked increase between days 35 and 49 of pregnancy that was associated with a rapid elevation in eCG concentrations. It is known that eCG facilitates the formation of secondary corpora lutea (CL) and stimulates the function of both primary and secondary luteal structures.^{5-6,9}

Probable Cause	Control Group	Experimental Group
Primary luteal deficiency	1	0
eCG deficiency	1	0
Primary luteolysis	2	4
Fetal death of non-endocrine origin	1	3
Twin pregnancy	1	0

As expected, the concentrations of eCG were significantly lower during normal pregnancies of mares carrying mule embryos than in those of mares impregnated by a horse ($P < .05$). Additionally, eCG concentrations returned to baseline much earlier in mares carrying mule embryos. The low concentrations of eCG in these mares failed to stimulate their luteal function, so that progesterone levels did not increase between days 35 and 49, as they clearly did in mares carrying horse embryos (Fig 1). Both the reduced function and early regression of endometrial cups in mares carrying mule embryos have been described before and are due to inadequate formation of the endometrial cups as well as to their premature immunologic rejection.^{1,5,11} In this study, the lack of eCG production during the normal pregnancy of a mare carrying a horse embryo was also associated with low progesterone concentrations after day 40 (Fig 5).

The low progesterone and eCG concentrations in mares carrying mule embryos did not affect embryonic survival, since all the mares used to calculate the curves in Figure 1 successfully carried out their pregnancies to term, including 7 mares that never showed detectable levels of eCG (see Fig 2). This would support the conclusion, reached by Allen,^{5,6} that eCG is not essential for pregnancy maintenance in the mare.

In spite of the lower progesterone concentrations of mares inseminated with donkey semen, the growth rate of their embryonic vesicles was similar to that of mares impregnated by stallions and to the growth rates reported by other authors both in mares and in ponies.¹³ This would suggest that even though a progesterone threshold level is required for pregnancy maintenance in the mare,^{6,16} this threshold would be considerably lower than that normally attained during intraspecific pregnancies, and elevations above the threshold level would not stimulate additional embryonic growth. The low concentrations of progesterone in mares carrying mule embryos would then be in most cases sufficient to reach the threshold required for pregnancy maintenance and normal embryonic growth.

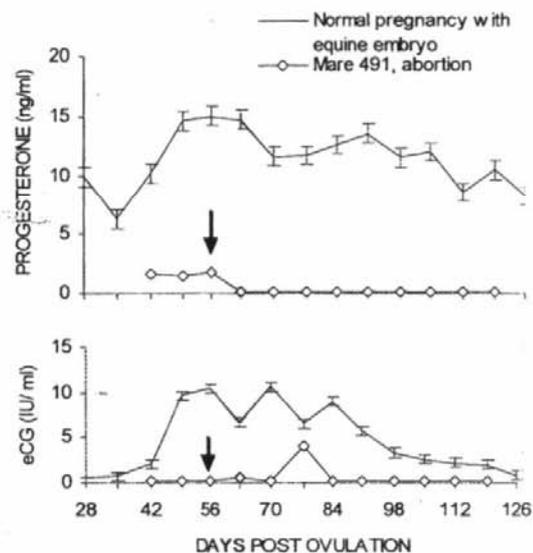


Figure 4. Progesterone and eCG concentrations in a mare (491) impregnated by a horse that lost her pregnancy on day 56. Her hormonal profiles are contrasted with the average concentrations for mares carrying equine conceptuses to term. The arrow indicates the day when absence of heartbeat of the product was detected by ultrasound.

In this study, both the rate of pregnancy loss in mares carrying horse embryos and its time of occurrence were similar to those reported by other authors.^{21,25} In contrast, the incidence of abortion among mares carrying mule embryos was extremely high (36.8%). To our knowledge, there are no previous studies about the incidence of pregnancy failure in mares carrying mule embryos. However, this high rate of pregnancy loss is consistent with the low reproductive efficiency reported in mares used for the production of mules.²⁻⁴

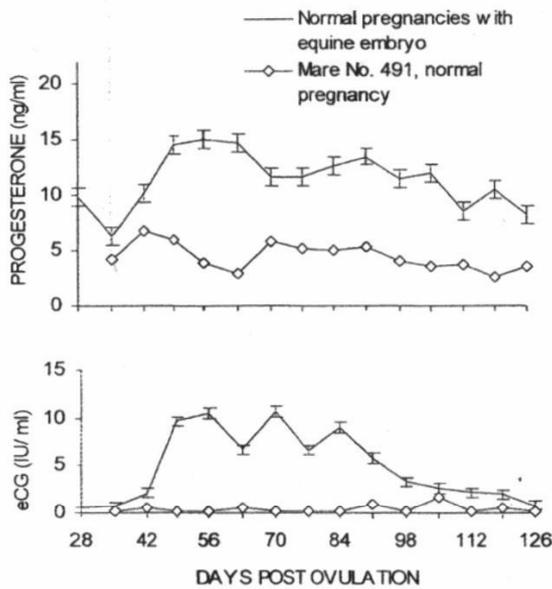


Figure 5. Progesterone and eCG concentrations in a mare (491) impregnated by a horse that carried out her pregnancy to term even though she had low concentrations of both hormones as compared with the average for mares with normal pregnancies.

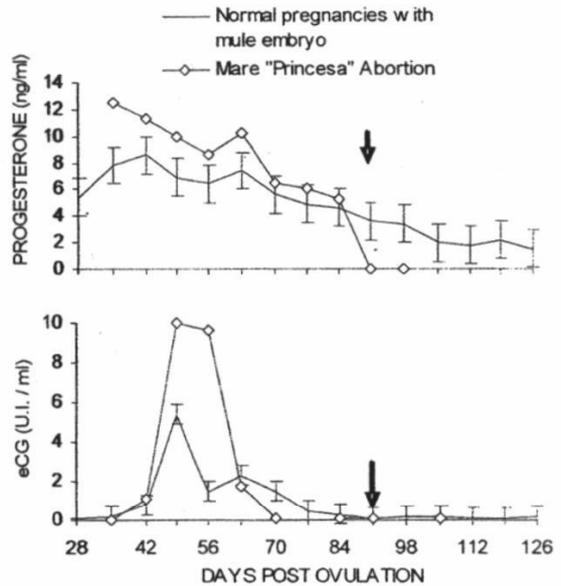


Figure 6. Progesterone and eCG concentrations in a mare (Princesa) carrying a mule embryo that lost her pregnancy on day 90 due to primary luteolysis. Her hormonal profiles are contrasted with the average concentrations for mares carrying mule conceptuses to term. The arrow indicates the day when death of the product was detected by ultrasonography.

It has been reported that a failure of the formation of endometrial cups is associated with a high rate (79%) of fetal mortality between day 80 and day 100 of pregnancies obtained by the transfer of donkey embryos to mares.^{5,26} This time frame is similar to that found in the mares carrying mule embryos in the current study, where abortion occurred on average on day 93 of pregnancy. However, in none of our mares impregnated by donkeys that aborted did the profiles of progesterone and eCG suggest that fetal loss was due directly to deficient luteal function caused by lack of eCG. In 3 of the cases, the progesterone concentrations at the time of abortion were similar to those found in mares carrying mule conceptuses to term; and in the other 4 cases, the decline in progesterone concentrations associated with the abortion was so abrupt that it suggested an active luteolytic process by prostaglandin F₂α (PGF₂ α) release²³ rather than luteal dysfunction due to lack of gonadotropic support.

Although this kind of active luteolysis is generally secondary to other alterations, it is possible that the lack of eCG rendered mares carrying a mule embryo more

susceptible than normal to an endogenous release of PGF₂α. In this regard, Allen²⁷ has proposed that after day 40 of gestation, eCG protects pregnant mares from the luteolytic effects of PGF₂α, protection that would not be present in our mares carrying mule embryos. Although he did not interpret his data in this way, Allen²⁷ found that mares that aborted donkey conceptuses, which also lack eCG, showed an abrupt progesterone decline a few days before the fetus was expelled, which would be consistent with an active luteolytic process occurring in an animal that is not protected by high levels of eCG.

Even if the premature endometrial cup reaction does not induce abortion through endocrine alterations, it could still be involved in pregnancy loss. The cell-mediated and humoral immune reactions against the antigens of the chorionic girdle^{1,5,11,28} could damage the placenta and affect survival of the product. It is known that pregnancy losses in mares carrying donkey embryos are associated with a failure in the formation of microcotyledons

and an intense and generalized maternal leucocytic response throughout the endometrial area in direct contact with the fetal membranes.⁵ Even though those donkey embryos are different from the mule embryos carried by the mares in the current study, the occurrence of similar failures in the development of the placenta of mule embryos cannot be discarded. For example, Allen et al¹¹ bisected mule embryos and transferred the demi-embryos to mares and female donkeys. They found that on day 62 of pregnancy, the mares with mule embryo had endometrial cups that were thinner, smaller, and more flaccid than those found in donkeys carrying genetically identical embryos. In addition, the endometrial tissue of those mares was necrotic, degenerated, and strongly infiltrated with maternal leucocytes. This type of damage could kill the embryo without the need for alterations in the luteal function and could explain the cases classified as fetal deaths of non-endocrine origin in the current study.

Of all the pregnancies followed in the current study, there was only 1 case in which pregnancy loss was associated with concentrations of both eCG and progesterone that were much lower than the average for the normal pregnancies of the same group (Fig 4). This case occurred in an intraspecific pregnancy of a mare that appears to have a genetic inability to produce normal concentrations of eCG,²⁹ since eCG concentrations were again low in a subsequent pregnancy in which the mare was again carrying a horse embryo. However, the second pregnancy was carried out to term, with progesterone concentrations that were below normal but higher than during the first unsuccessful pregnancy (Fig 5), thus supporting the idea that there is not an absolute need for eCG during the equine pregnancy.

If eCG is not an absolute requirement for pregnancy in the mare, it is interesting to speculate about its role in equine reproduction. In this respect, it should be kept in mind that all the mares used in this study were served during the first few months of the breeding season. Thus, the first half of their pregnancy evolved during the time of the year when LH concentrations are not heavily depressed.^{27,30,31} It is possible that during this time of the year, pituitary LH could have provided a strong enough luteotropic stimulus to attain the threshold concentrations of progesterone required to maintain pregnancy, even in the absence of eCG. In this regard, Allen⁶ described evidence suggesting that pituitary LH can support luteal function in the absence of eCG in mares carrying donkey embryos. It remains to be seen if pregnancy can be maintained in the absence of eCG secretion when the first half of pregnancy coincides with the nonbreeding season of the year, when pituitary LH

concentrations are normally depressed.^{31,32} Allen^{5,6,27} has wondered about the evolutionary reason for the secretion of an apparently nonessential gonadotropic hormone from a placental source that exposes the fetus to an apparently unnecessary immunologic risk. A seasonally driven need for eCG could be such a reason, and this hypothesis deserves to be tested.

It is concluded that the incidence of pregnancy loss is higher in mares carrying a mule embryo than in mares carrying a horse embryo. This is not due directly to the reductions in eCG and progesterone secretion that are associated with the inadequate formation and premature regression of endometrial cups occurring in mares with interspecific pregnancy. However, the lack of eCG could facilitate the occurrence of some abortions in which active luteolysis appears to be involved.

ACKNOWLEDGMENTS

Myriam Boeta was supported by a postgraduate scholarship by CONACyT, Mexico. The experimental work was supported in part by a PAPIIT grant from DGAPA, UNAM. The authors thank professor Dan Sharp for critical review of the manuscript.

REFERENCES

1. Allen WR, Kydd JH, Antczak DF. Interspecies and extraspecies equine pregnancies. In: McKinnon AO, Voss JL, editors. Equine reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger;1993. pp 533-53.
2. Beltrán JM. La producción equina en Cataluña. Estudio general de este problema. Ganadería Madrid 1949;8:23-5.
3. Beltrán JM. Importancia que revisten las crías caballar, mular y asnal. Ganadería Madrid 1950;8:680-2.
4. Jordao LP, De Camargo MX, Gouveia PF. Eficiência na reprodução, das éguas mulateiras da coudelaria paulista. Bol Industr Animal 1954;14:49-62.
5. Allen WR. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. Reproduction 2001;121:513-27.
6. Allen WR. Hormonal control of early pregnancy in the mare. Anim Reprod Sci 1984;7:269-82.
7. Allen WR, Kydd JH, Boyle MS, Antczak DF. Extraspecific donkey-in-horse pregnancy as a model of early fetal death. J Reprod Fert Suppl 1987;35:197-209.
8. Saint-Dizier M, Chopineau M, Dupont J, Daels PF, Combarrous Y. Expression and binding activity of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in the primary corpus luteum during early pregnancy in the mare. Biol Reprod 2003;69:1743-9.
9. Bergfelt DR, Pierson RA, Ginther OJ. Resurgence of the primary corpus luteum during pregnancy in the mare. Anim Reprod Sci 1989;21:261-70.
10. Murphy BD, Martinuk SD. Equine chorionic gonadotrophin. Endocr Rev 1991;12:27-44.
11. Allen WR, Skidmore JA, Stewart F, Antczak DF. Effects of fetal genotype and uterine environment on placenta development in equids. J Reprod Fert 1993;97:55-60.
12. Boeta M, Zarco QL. Utilización de leche descremada ultrapas- teurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas. Vet Mex 2000;31:67-9.
13. Ginther OJ. Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare. 2nd ed. Cross Plains (Wisc): Equiservices; 1986.
14. Pulido A, Zarco L, Galina CS, Murcia C, Flores G, Posadas E. Progesterone metabolism during storage of blood samples from

- Gyr cattle: effects of anticoagulant, time and temperature of incubation. *Theriogenology* 1991;35:965-75.
15. Jeffcott LB, Hyland AA, MacLean TD, Smith-Robertson G. Changes in maternal hormone concentrations associated with induction of fetal death at day 45 of gestation in mares. *J Reprod Fert* 1987;35(Suppl):461-7.
 16. Bergfelt DR, Woods JA, Ginther OJ. Role of the embryonic vesicle and progesterone in embryonic loss in mares. *J Reprod Fert* 1992;95:339-47.
 17. Steel RGD, Torrie JH. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 2nd ed. Singapore: McGraw-Hill; 1981.
 18. Squires EL. Endocrinology of pregnancy. In: McKinnon AO, Voss JL, editors. *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. pp 495-500.
 19. Urwin VE, Allen WR. Pituitary and chorionic gonadotropic control of ovarian function during early pregnancy in equids. *J Reprod Fert Suppl* 1982;32:371-81.
 20. Kindahl H, Knudsen O, Madej A, Edqvist L-E. Progesterone, prostaglandin F₂- α , PMSG and oestrone sulphate during early pregnancy in the mare. *J Reprod Fert Suppl* 1982;32:353.
 21. Ginther, OJ. *Reproductive biology of the mare*. Cross Plains (Wisc): Equiservices; 1992.
 22. Madej A, Kindahl H, Nydahl C, Edqvist LE, Stewart DR. Hormonal changes associated with induced late abortions in the mare. *J Reprod Fert Suppl* 1987;35:479-84.
 23. Daels PF, Stabenfeldt GH, Kindahl H, Hughes JP. Prostaglandin release and luteolysis associated with physiological and pathological conditions of the reproductive tract in the mare. A review. *Equine Vet J Suppl* 1989;8:29-34.
 24. Daels PF, Stabenfeldt GH, Hughes JP, Odensvik H, Kindahl H. Evaluation of progesterone deficiency as a cause of fetal death in mares with experimentally induced endotoxemia. *Am J Vet Res* 1991;52:282-8.
 25. Hemberg E, Lundeheim N, Einarsson S. Reproductive performance of Thoroughbred mares in Sweden. *Reprod Com Anim* 2004;39:81-5.
 26. Antczak DF, Allen WR. Maternal immunologic recognition of pregnancy in equids. *J Reprod Fert Suppl* 1989;37:69-78.
 27. Allen WR. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. *Reprod Dom Anim* 2001;36:121-31.
 28. Kydd JH, Butcher GW, Antczak DF, Allen WR. Expression of major histocompatibility complex MHC class I molecules on early trophoblast. *J Reprod Fert Suppl* 1991;44:463-77.
 29. Manning AW, Rajkumar K, Bristol F, Flood PF, Murphy BD. Genetic and temporal variation in serum concentrations and biological activity of horse chorionic gonadotrophin. *J Reprod Fert Suppl* 1987;35:389-97.
 30. Daels PF, Albrecht BA, Mohammed HO. Equine chorionic gonadotropin regulates luteal steroidogenesis in pregnant mares. *Biol Reprod* 1998;59:5:1062-8.
 31. Freedman LJ, Garcia MC, Ginther OJ. Influence of ovaries and photoperiod on reproductive function in the mare. *J Reprod Fert Suppl* 1979;27:79-86.
 32. Sherman GB, Wolfe MW, Farmerie TA, Clay CM, Threadgill DS, Sharp DC, Nilson JH. A single gene encodes the β subunits of equine luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *Mol Endocr* 1992;6:951-9.

7.1 MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el antiguo Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agrícola y Ganadera (CEIEPAG) de la FMVZ, localizado en Chalco, Estado de México a 19° 09" Latitud Norte. Se utilizaron 54 yeguas sanas entre los 5 y 10 años de edad de raza criolla, las cuales fueron divididas en cuatro grupos: 1) 14 yeguas inseminadas con burro en el mes de abril; 2) 10 yeguas inseminadas con caballo en el mismo mes. 3) 18 yeguas inseminadas con burro en el mes de junio; 4) 12 yeguas inseminadas con caballo en el mismo mes.

Antes de inseminar a cada yegua se le realizó un examen físico general, para descartar cualquier enfermedad, así como un examen ginecológico completo para verificar la ausencia de condiciones patológicas clínicamente detectables. Posteriormente las yeguas fueron sincronizadas con un progestágeno (altrenogest) administrado diariamente por vía oral en dosis de .044 mg/Kg. durante 9 días (Webel y Squires, 1982). Una vez en estro se revisaron ultrasonográficamente para programar la inseminación artificial en el momento más cercano a la ovulación, utilizando en la mayoría de los casos hCG (1500-3000 UI) (Ginther, 1986) para programar la ovulación. Para la inseminación artificial se colectó semen de burro de un semental de la raza Kentucky, utilizando para ello una vagina artificial modelo Missouri. El semen se diluyó 3:1 en leche descremada ultra pasteurizada (Boeta y Zarco, 2000) conservándose a 5°C en un equitainer (Hamilton Thorn) hasta la inseminación artificial.

Se realizó diagnóstico de gestación a partir de los 12 días post-inseminación con un ultrasonido Sonovet 600 de tiempo real y un transductor de 5 Mhz. A partir de los 30 días de gestación se realizaron 2 veces a la semana ultrasonidos para determinar la viabilidad embrionaria, el ritmo de crecimiento de la vesícula fetal, así como el número y diámetro de los cuerpos lúteos (Ginther, 1986). Se utilizó un equipo de ultrasonido con transductor lineal de 5 Mhz hasta el día 60 de la gestación, y posteriormente de 3.5Mhz hasta los 150 días. En cada evaluación se determinó la viabilidad embrionaria o fetal mediante la presencia de latido

cardiaco, movimiento fetal y/o pulsación del cordón umbilical del producto (Ball, 1993).

Se determinaron los patrones de eCG, progesterona y sulfato de estrona durante los 5 primeros meses de la gestación. Para ello, a partir de la 5ª semana de gestación se obtuvieron dos veces a la semana muestras sanguíneas de cada yegua mediante punción de la vena yugular, utilizando tubos al vacío con gel activador del suero. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos dentro de la primera hora posterior a su obtención para separar el suero, el cual se mantuvo en congelación a -20 °C. En las muestras se determinaron las concentraciones de progesterona y gonadotropina coriónica equina para evaluar la funcionalidad de los cuerpos lúteos y de las copas endometriales respectivamente. También se determinaron las concentraciones de sulfato de estrona como un estimador de bienestar fetal (Kindhal et al., 1982).

Para la determinación de las concentraciones de progesterona se utilizó un radioinmunoanálisis de fase sólida (Pulido et al, 1991), que tuvo coeficientes de variación intra e interensayo del 4.1 y 7.3 % respectivamente. Las concentraciones de sulfato de estrona se midieron con un radioinmunoanálisis de fase sólida (DPC) con coeficientes de variación intra e interensayo de 5.3 y 4.2% respectivamente.

Para medir las concentraciones de eCG se utilizó un enzimoimmunoensayo en placas de micro titulación (Paramedikal, Faiano, Italia) El método mostró un coeficiente de variación intraensayo del 7.14% para los valores bajos y 11.66% para valores altos y un coeficiente de variación interensayo del 10%.

Se calcularon las medias mínimo cuadráticas de las concentraciones semanales de progesterona, eCG y sulfato de estrona en las gestaciones normales (en las que no se perdió el producto), comparándose las concentraciones de cada hormona por medio de análisis de varianza en un diseño de mediciones repetidas, utilizando como variables independientes la época del año (gestante en época ovulatoria o anovulatoria), el tipo de gestación (con caballo o con burro), y la semana de gestación, con el efecto de individuo anidado dentro de la interacción época del año por tipo de gestación. Se comparó el día de la destrucción de las

copas endometriales (disminución de la eCG circulante a niveles no detectables) y pérdida de la función lútea (reducción de las concentraciones de progesterona a menos de 1 ng/ml) entre grupos mediante un análisis de varianza de dos factores (época y tipo de gestación.) (Steel, Torrie, 1981).

Se comparó el número de muertes embrionarias (antes del día 40) y abortos (después del día 40) ocurridas en los 2 grupos (Prueba exacta de Fisher) (Steel, Torrie, 1981). Se utilizó la prueba de T para comparar la semana de aparición del 2º y 3º cuerpo lúteo de acuerdo al tipo de gestación (con caballo o burro), de la misma forma se calculó el número de cuerpos lúteos que se presentaron en cada tipo de gestación.

En caso de pérdida de gestación se compararon los niveles de progesterona, eCG y sulfato de estrona de la yegua involucrada, contra los promedios semanales durante gestaciones normales del mismo grupo de yeguas.

Se consideró como muerte embrionaria primaria cuando no se encontró ninguna anomalía en las concentraciones hormonales antes de que ocurriera la muerte del embrión (Allen, 2001a). Se consideró que la muerte embrionaria se debió a regresión prematura de copas endometriales si las concentraciones de eCG y progesterona circulantes disminuyeron por debajo de lo normal para el tipo de gestación antes de registrarse la muerte embrionaria, o simultáneamente con ella (Allen, 2001a). En los casos en que las concentraciones de eCG se mantuvieron normales después de detectarse la muerte embrionaria se consideró que ésta se produjo por causas diferentes a la falla de producción de eCG (Allen, 2001b).

Se consideró como falla lútea primaria cuando las concentraciones de progesterona de la yegua que perdió la gestación se mantuvieron considerablemente más bajas de lo normal durante todo el estudio, sin llegar a producirse la regresión lútea antes de perderse la gestación (Allen, 2001a). Se consideró que la muerte embrionaria se debió a luteólisis activa cuando las concentraciones de progesterona disminuyeron abruptamente inmediatamente antes de la muerte del producto, sin haber alteración de las concentraciones de eCG (Daels et al, 1998).

7.2 RESULTADOS

7.2.1 Concentraciones hormonales durante gestaciones normales

Con el objeto de evaluar los efectos de la época del año y del tipo de gestación sobre las concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona se compararon las concentraciones promedio de dichas hormonas para cada combinación época X tipo de gestación, tomando en cuenta para ello solamente los datos de yeguas que mantuvieron la gestación hasta llegar a término (gestación normal). Para ello se utilizó inicialmente un análisis de varianza para mediciones repetidas, con la época, tipo de gestación y semana de gestación como efectos principales, y el animal anidado dentro de la interacción época X tipo de gestación. Debido a que no se encontró ningún efecto de la época del año se repitió el análisis estadístico utilizando solamente el tipo de gestación y semana de gestación como efectos principales, con el animal anidado dentro del tipo de gestación. Por esta razón, de aquí en adelante se presentan los resultados sin considerar la época en la que ocurrió la gestación.

La figura 7.1 muestra que las concentraciones de progesterona (media \pm error estándar) durante gestaciones normales fueron significativamente mayores en las yeguas gestantes con embrión equino que en las yeguas gestantes con embrión mula a partir de la octava semana de la gestación ($p < 0.01$). En el caso de las yeguas servidas con caballo las concentraciones de progesterona muestran una abrupta elevación en la semana 8, a partir de la cual se mantienen en rangos cercanos a los 15 ng/ml hasta la semana 17. En cambio en las yeguas servidas con burro a partir de la semana 8 se inicia un gradual descenso en las concentraciones de progesterona hasta alcanzar niveles menores a 5 ng/ml en la semana 15 de la gestación.

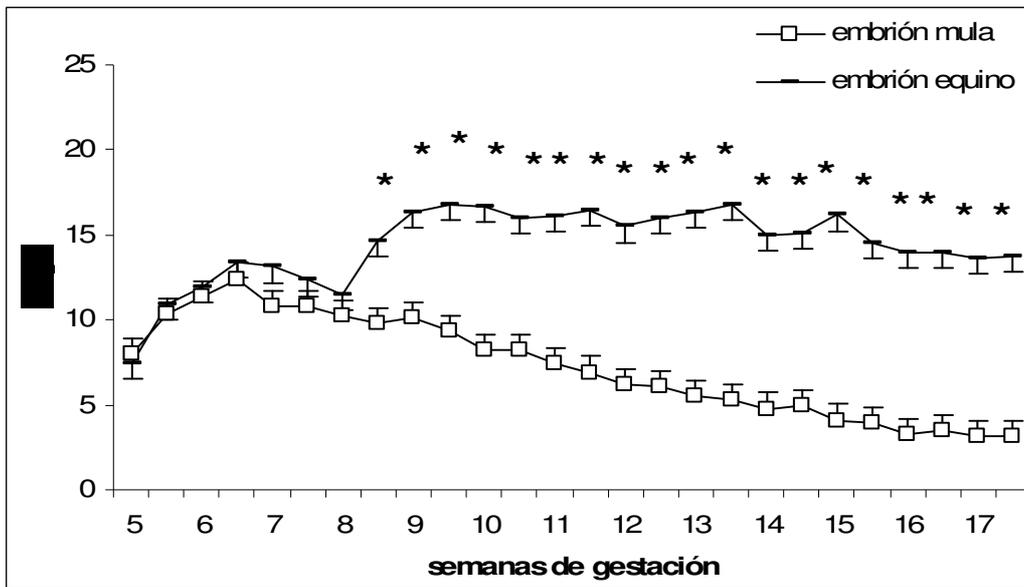


Figura 7.1 Concentraciones de progesterona durante gestaciones normales en yeguas servidas con burro o yeguas servidas con caballo. Las concentraciones de progesterona fueron significativamente ($P < 0.01$) más elevadas en las yeguas servidas con caballo que en las yeguas servidas con burro a partir de la octava semana de la gestación.

Las concentraciones de eCG (media \pm error estándar) durante gestaciones normales fueron mayores ($p < 0.01$) en las yeguas gestantes con embrión equino que en las yeguas gestantes con embrión mula desde la semana 6.5 hasta la semana 14 (figura. 7.2). En el caso de las yeguas servidas con caballo las concentraciones de eCG comenzaron a elevarse desde que se inició el muestreo en la semana 6 de la gestación, elevándose muy rápidamente hasta llegar a un pico de 470 UI/ml en la semana 7.5 de la gestación. A partir de ese momento las concentraciones de eCG disminuyen gradualmente hasta que terminó el muestro en la semana 17 de la gestación, momento en el que las concentraciones de eCG aún se encontraban ligeramente elevadas (21 UI/ml).

En el caso de las yeguas servidas con burro las concentraciones de eCG se elevaron muy poco, llegando a un pico de tan solo 50 UI/ml en la semana 7 de la gestación y regresando a niveles basales en la semana 13.

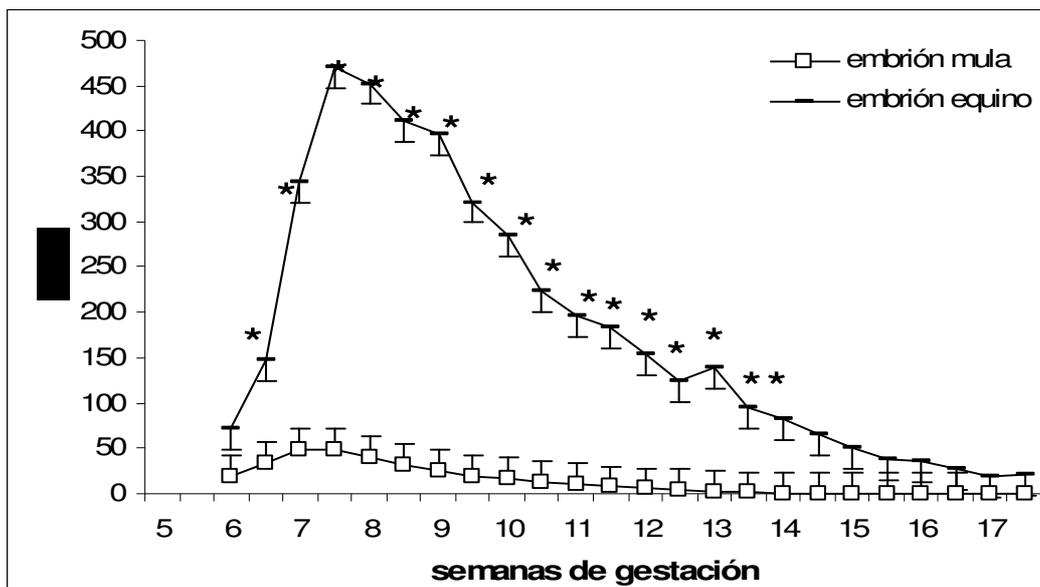


Figura 7.2 Concentraciones de eCG durante gestaciones normales en yeguas servidas con burro o yeguas servidas con caballo. Las concentraciones de eCG fueron significativamente ($P < 0.01$) más elevadas en las yeguas servidas con caballo que en las yeguas servidas con burro desde la semana 6 hasta la semana 14.5 de la gestación.

En la figura 7.3 se observa que las concentraciones de sulfato de estrona durante gestaciones normales fueron muy similares en ambos grupos a lo largo de la gestación, comenzando a elevarse en la semana 11 y aumentando en forma continua hasta el último periodo de muestreo, cuando alcanzaron 600 ng/ml.

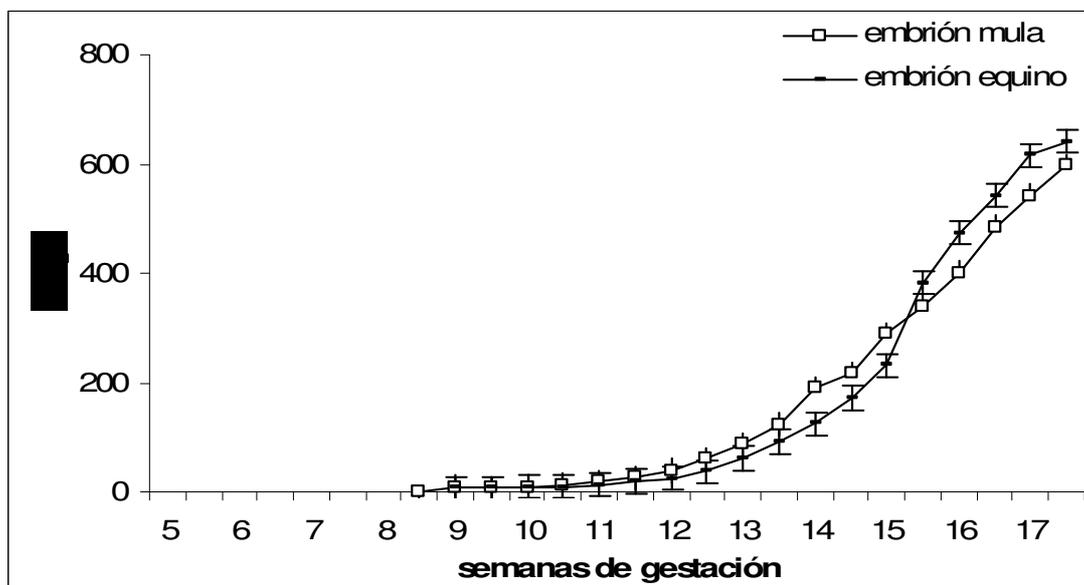


Figura 7.3 Concentraciones de sulfato de estrona durante gestaciones normales en yeguas servidas con burro o yeguas servidas con caballo. No hubo diferencias significativas entre los grupos ($p > 0.05$).

7.2.2. Formación de cuerpos lúteos accesorios

A lo largo del estudio se presentaron ovulaciones accesorias tanto en el grupo de yeguas servidas con caballo como en el de yeguas servidas con burro (figura 7.4). El número promedio de cuerpos lúteos que se acumularon a lo largo de las gestaciones normales en yeguas servidas con caballo (2.9 ± 0.2) fue significativamente mayor ($p < 0.01$) que el de yeguas servidas con burro (2.2 ± 0.1).

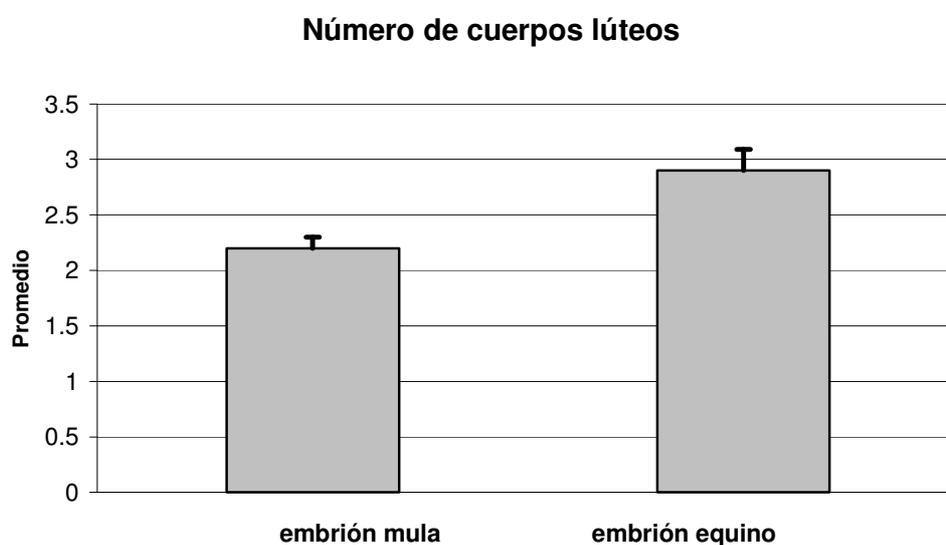


Figura 7.4 Número de cuerpos lúteos (media \pm ee) que se acumularon en gestaciones normales en yeguas servidas con burro y yeguas servidas con caballo. La diferencia entre grupos es significativa ($p < 0.01$)

En la figura 7.5 se observa que todas las yeguas tuvieron por lo menos una ovulación accesoria durante la gestación, por lo que ninguna yegua permaneció solamente con el cuerpo lúteo original de la gestación. En el caso de las yeguas servidas con burro, la gran mayoría tuvieron una sola ovulación accesoria, por lo que acumularon 2 cuerpos lúteos. En cambio, las yeguas servidas con caballo tuvieron similar probabilidad de tener 1, 2 o 3 ovulaciones accesorias, resultando en un total de 2, 3 o 4 cuerpos lúteos.

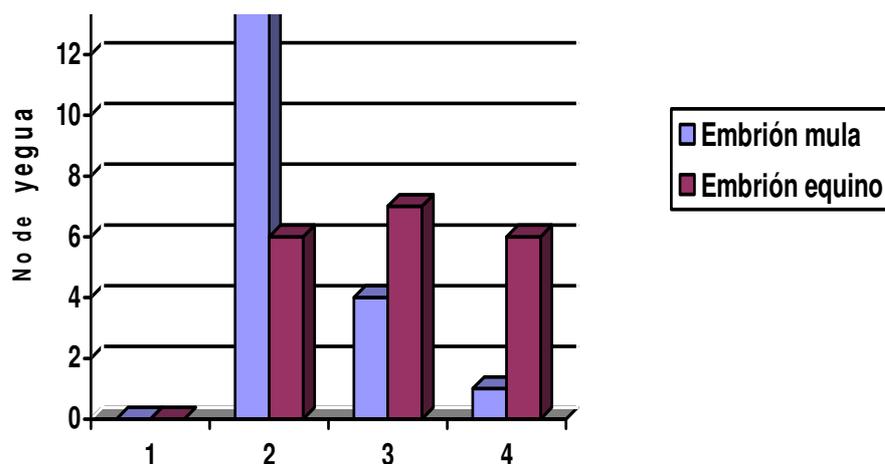


Figura 7.5 Clasificación de las yeguas de acuerdo al número total de cuerpos lúteos que acumularon durante la gestación. La distribución del número de cuerpos lúteos es diferente entre los grupos ($p < 0.05$).

La primera ovulación accesoria (aparición del segundo cuerpo lúteo) en las yeguas servidas con burro ocurrió en promedio en la semana 7 ± 0.4 de la gestación, y en las yeguas servidas con caballo ocurrió a las 6.7 ± 0.3 semanas. La aparición del tercer cuerpo lúteo en las 4 yeguas servidas con burro que formaron un tercer cuerpo lúteo ocurrió a las 10.5 ± 1.2 semanas, mientras que en las 7 yeguas servidas con caballo que formaron un tercer cuerpo lúteo esto ocurrió en la semana 8.4 ± 0.4 . La yegua servida con burro que llegó a formar un cuarto cuerpo lúteo lo hizo en la semana 11 y las de caballo en la semana 10.4 ± 0.4 .

En la figura 7.6 se muestran las concentraciones de progesterona y eCG en yeguas servidas con caballo clasificadas de acuerdo al número total de cuerpos lúteos que llegaron a tener durante la gestación. Se puede observar que en las yeguas en las que se formó un tercer CL (yeguas de los grupos 3 CL y 4 CL) las concentraciones de eCG durante las dos semanas anteriores a la formación de dicho cuerpo lúteo fueron significativamente superiores ($p < 0.05$) a las de las yeguas que solamente se quedaron con 2 CL. De la misma forma, las yeguas que formaron un cuarto CL (grupo 4 CL) tuvieron durante las dos semanas previas a dicha ovulación concentraciones de eCG significativamente superiores ($p < 0.05$) a los de las yeguas que no tuvieron dicha ovulación (grupos 2 CL y 3 CL). En el caso de la progesterona, las concentraciones de las yeguas del grupo 4 CL

siempre fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que las de las yeguas del grupo 2 CL y también fueron significativamente superiores a las del grupo 3 CL durante casi todo el tiempo, con excepción de las cuatro semanas posteriores a la formación del tercer cuerpo lúteo, cuando la diferencia entre los grupos 4 CL y 3 CL se redujo a un nivel no significativo debido a una marcada elevación en las concentraciones de progesterona del grupo 3 CL entre la semana 8 y 9 de la gestación, inmediatamente después de la formación del tercer cuerpo lúteo en dichas yeguas.

7.2.3. Relación entre el número de cuerpos lúteos y las concentraciones hormonales.

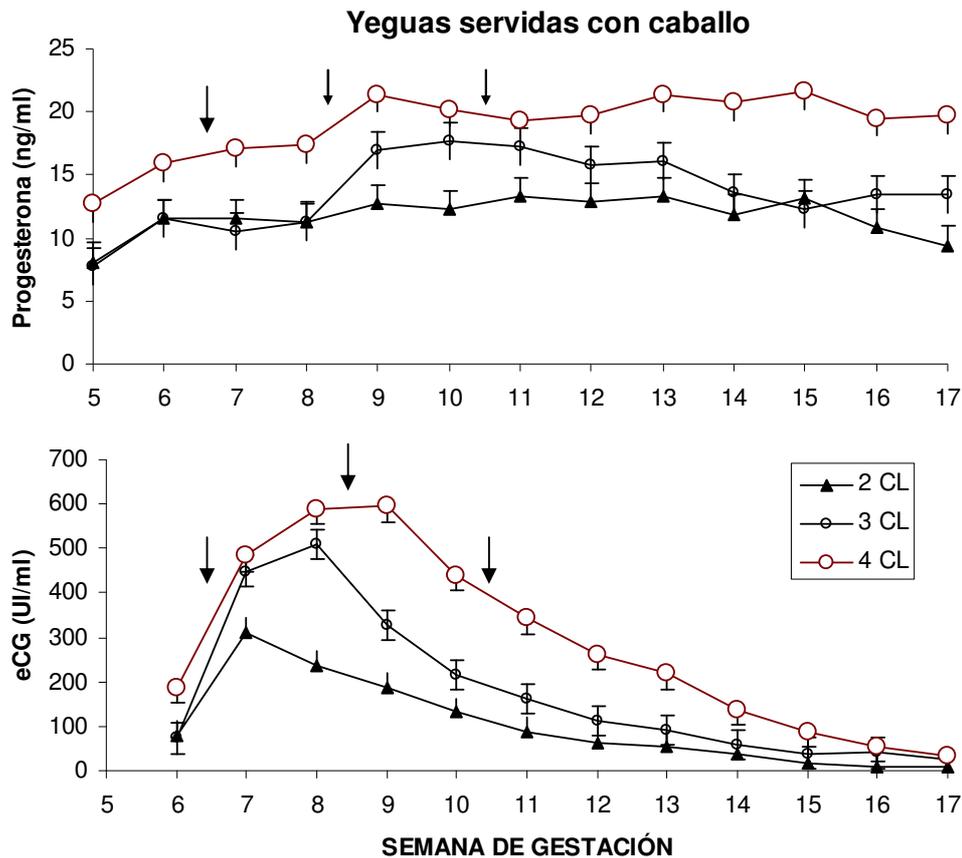


Figura 7.6. Concentraciones de progesterona y eCG en yeguas servidas con caballo que a lo largo de la gestación acumularon 2, 3 o 4 cuerpos lúteos (2 CL, 3CL, 4CL). Las flechas izquierda, central y derecha indican respectivamente el momento promedio en el que se formó el segundo, tercero o cuarto cuerpo lúteo de la gestación.

En la figura 7.6 bis se muestran las concentraciones de progesterona y eCG de las yeguas servidas con burro, clasificadas de acuerdo al número de cuerpos lúteos que acumularon durante su gestación. No existieron diferencias en las concentraciones de eCG o progesterona entre las yeguas con 2 o con 3 cuerpos lúteos ($p>0.05$). Por otra parte, aunque las concentraciones de ambas hormonas parecen ser marcadamente mayores en el grupo 4 CL, debe destacarse que este grupo incluyó una sola yegua, por lo que no existe diferencia significativa con los otros grupos.

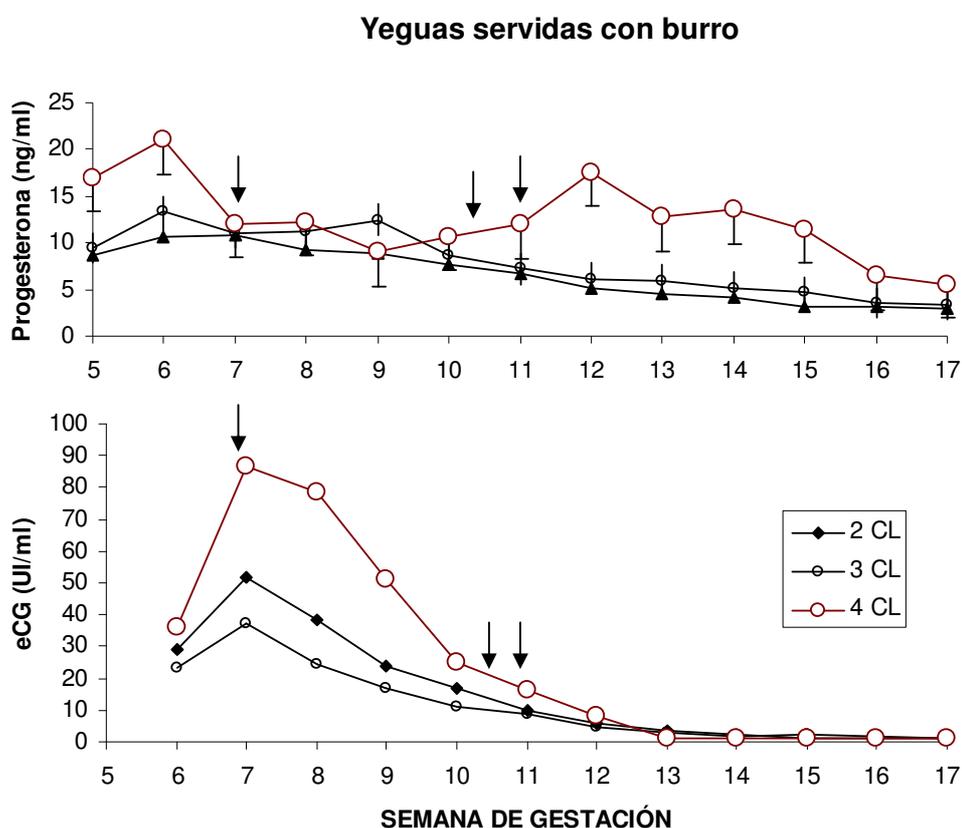


Figura 7.6 bis. Concentraciones de progesterona y eCG en yeguas servidas con burro que a lo largo de la gestación acumularon 2, 3 o 4 cuerpos lúteos (2 CL, 3CL, 4CL). Las flechas izquierda, central y derecha indican respectivamente el momento promedio en el que se formó el segundo, tercero o cuarto cuerpo lúteo de la gestación.

7.2.4 Relación entre concentraciones de eCG y concentraciones de progesterona

Para conocer los efectos de las concentraciones de eCG sobre las de progesterona se realizó, para cada tipo de gestación, un análisis de regresión utilizando las concentraciones de progesterona como variable dependiente y las concentraciones de eCG y el número de cuerpos lúteos como variables dependientes.

En el caso de la gestación con embrión burro, la relación se describe por la ecuación:

$$P4 = 3.04 + 0.091(eCG) + 1.44 (\text{No CL}) + \varepsilon$$

Los dos coeficientes de regresión son altamente significativos ($p < 0.001$). El coeficiente de correlación múltiple fue de 0.51 ($p < 0.01$).

En el caso de la gestación con embrión equino, la relación se describe por la ecuación:

$$P4 = 4.79 + 0.014(eCG) + 2.99 (\text{No CL}) + \varepsilon$$

Los dos coeficientes de regresión son altamente significativos ($p < 0.001$). El coeficiente de correlación múltiple fue de 0.44 ($p < 0.01$).

7.2.5. Mortalidad embrionaria y fetal

La incidencia general de mortalidad embrionaria (antes del día 40 de la gestación) en el presente trabajo fue del 7.4 % (Cuadro 7.1). Solamente reabsorbieron sus embriones 2 yeguas servidas con burro en el mes de junio, que los perdieron en los días 21 y 32 de la gestación, y 2 yeguas servidas con caballo en el mes de abril, que perdieron sus embriones en los días 38 y 40. No se encontraron diferencias significativas ni entre época ni entre tipos de gestación (Cuadro 1).

Cuadro 7.1.- Incidencia de mortalidad embrionaria (antes del día 40 de gestación) en yeguas gestantes con embrión equino o con embrión mula en gestaciones que comenzaron en el mes de junio o en el mes de abril.

YEGUAS SERVIDAS EN	Embrión mula	Embrión equino	Total
Junio	11.1 % (2/18)	0 % (0/12)	6.7 % (2/30)
Abril	0 % (0/14)	20 % (2/10)	8.3 % (2/24)
Promedio	6.2 % (2/32)	9.1 % (2/22)	7.4 % (2/54)

Las diferencias entre épocas o tipos de gestación no son significativas ($P > 0.05$)

La incidencia de abortos (cuadro 7.2) se calculó a partir de las yeguas que llegaron gestantes a la etapa fetal (día 41 de la gestación). De las yeguas inseminadas en el mes de junio llegaron a la etapa fetal 16 yeguas gestantes con burro que posteriormente sufrieron 4 abortos entre los días 56 y 97 días de la gestación, y 12 yeguas servidas con caballo, ninguno de los cuales abortó posteriormente. En el caso de las yeguas inseminadas en el mes de abril llegaron a la etapa fetal 14 yeguas servidas con burro, 5 de las cuales abortaron entre el día 80 y 98 de la gestación, y 8 yeguas servidas con caballo, de las cuales solamente una abortó, lo que ocurrió en el día 103 de la gestación. La incidencia

promedio de abortos fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en yeguas servidas con burro (30 %) que en yeguas servidas con caballo (5 %). En cuanto al efecto de época, aunque en las yeguas servidas en abril la incidencia de abortos fue casi el doble que en las servidas en junio, dicha diferencia no alcanzó el nivel de significancia ($p > 0.05$)

Cuadro 7.2.- Incidencia de abortos (pérdida de gestación después del día 40) en yeguas gestantes con embrión equino o con embrión mula en gestaciones que comenzaron en el mes de junio o en el mes de abril.

YEGUAS SERVIDAS EN	Embrión mula	Embrión equino	Total
Junio	25 % (4/16)	0 % (0/12)	14.3 % (4/28)
Abril	36 % (5/14)	12.5 % (1/8)	27.2 % (6/22)
Promedio	30 % ^a (9/30)	5 % ^b (1/20)	20 % (10/50)

^{a,b} La diferencia en el número promedio de abortos entre tipo de gestación es significativa ($p < 0.05$). La diferencia entre épocas no es significativa.

Al comparar el número total de pérdidas de la gestación (mortalidad embrionaria + abortos), se encontró que en las gestaciones que comenzaron en el mes de junio hubo significativamente más ($p < 0.05$) pérdidas de gestación entre las yeguas gestantes con burro que en las gestantes con caballo (Cuadro 7.3). En las gestaciones que comenzaron en el mes de abril no hubo diferencia significativa en la incidencia de pérdida de gestación ($p > 0.05$). Al combinar las dos épocas se encontró que la pérdida de gestaciones casi se triplicó en las yeguas gestantes con embrión mula con respecto a las gestantes con embrión equino, a pesar de lo cual la diferencia no llegó a ser significativa. Las diferencias entre épocas no fueron significativas en ningún tipo de gestación.

Cuadro 7.3.- Incidencia total de pérdida de gestación en yeguas gestantes con embrión equino o con embrión mula en gestaciones que comenzaron en el mes de junio o en el mes de abril.

YEGUAS SERVIDAS EN	Embrión mula	Embrión equino	Total
Junio	33.3 % ^a (6/18)	0 % ^b (0/12)	20 % ^{ab} (6/30)
Abril	36 % ^a (5/14)	30 % ^{ab} (3/10)	33.3 % ^a (8/24)
Total	34.3 % ^a (11/32)	13.6 % ^{ab} (3/22)	25.9 % ^{ab} (14/54)

^{a,b} Valores que no comparten por lo menos una literal son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

7.2.6 Descripción de los casos de aborto en yeguas servidas con burro.

En las yeguas gestantes con embrión mula se presentaron 2 reabsorciones embrionarias y 8 abortos. Las reabsorciones embrionarias se produjeron antes de que se iniciaran los muestreos sanguíneos, por lo que no es posible describir sus características endocrinas.

En el caso de los abortos, al analizar las relaciones entre las concentraciones de cada una de las hormonas, los hallazgos ultrasonográficos y los hallazgos histopatológicos, fue posible clasificarlos en cuatro grupos de acuerdo a sus posibles causas, que se resumen en el cuadro 7.4.

Cuadro 7.4 Clasificación de las yeguas servidas con burro que abortaron de acuerdo a la causa aparente del aborto

CAUSA APARENTE	Número
	1
Deficiencia lútea primaria	
Deficiencia lútea asociada con baja producción de eCG	3
Luteolisis activa	2
Combinación deficiencia lútea primaria/luteolisis activa	1
Patología traumático/infecciosa	2
Total	9

7.2.6.1 Yegua con deficiencia lútea primaria que abortó un embrión mula.

Bajo esta clasificación se sitúa una yegua (“Apache”) con concentraciones de progesterona considerablemente menores a las encontradas en las yeguas servidas con burro que tuvieron gestación normal, a pesar de que sus concentraciones de eCG fueron similares a las de las yeguas con gestación normal. En la figura 7.7 se observa esta yegua produjo en todo momento concentraciones de eCG iguales o superiores a los promedios de las yeguas servidas con burro que no abortaron. Sus concentraciones de progesterona también fueron similares a las de yeguas normales durante las primeras 8 semanas de la gestación, formando inclusive un cuerpo lúteo secundario durante la semana 7. Sin embargo, a partir de la semana 9 sus concentraciones se redujeron a menos de la mitad de lo normal, y continuaron descendiendo gradualmente hasta llegar a niveles basales en la semana 11, cuando se registró el aborto. Como era de esperarse, las concentraciones de sulfato de estrona desaparecieron rápidamente una vez producido el aborto. No se encontraron cambios patológicos en la placenta ni en el feto.

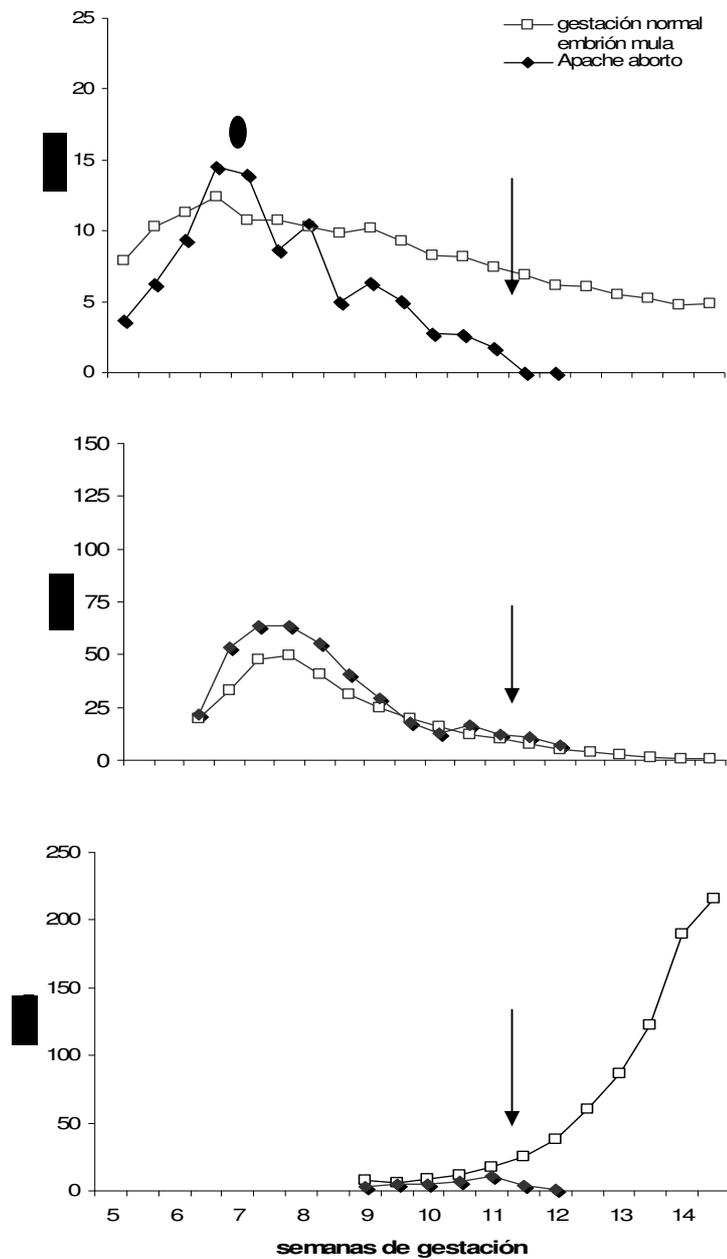


Figura 7.7 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión mula que sufrió aborto por una deficiencia lútea primaria, Las flechas indican el momento en que se registró la muerte fetal. El pico de progesterona en la semana 7 coincidió con la formación de un cuerpo lúteo accesorio, que se indica con un óvalo negro.

7.2.6.2 Yeguas con deficiencia lútea asociada con baja producción de eCG y que abortaron embriones mula

En 3 de las yeguas servidas con burro que abortaron se encontraron concentraciones tanto de progesterona como de eCG considerablemente menores a los niveles promedio de las gestaciones normales de yeguas servidas con burro. Los perfiles hormonales de estas yeguas se muestran en las figuras 7.8 a 7.10.

La yegua “Perla” (figura 7.8) representa un caso extremo de deficiencia en la producción de eCG, ya que en ningún momento mostró elevación alguna en las concentraciones de esta hormona. Sus niveles de progesterona se mantuvieron muy por debajo del promedio para yeguas servidas con burro, excepto durante una elevación transitoria que se presentó entre las semanas 7 y 8, coincidiendo con la formación de un cuerpo lúteo accesorio. A partir de ese momento los niveles de progesterona disminuyeron a un ritmo mucho mayor que el de las yeguas normales, llegando a 0 en la semana 12.5, cuando se produjo el aborto. Las concentraciones de sulfato de estrona siempre se mantuvieron muy por debajo de lo normal, indicando fallas en el funcionamiento de la unidad feto-placentaria. Sin embargo, no se encontraron cambios histopatológicos en la placenta ni en el producto.

La yegua “Isabela” (figura 7.9) también acusó una marcada y continua deficiencia en la producción de eCG, a pesar de lo cual en la semana 7 formó un cuerpo lúteo accesorio. Sus concentraciones de progesterona se mantuvieron normales hasta la semana 7.5, a partir de la cual se inició una vertiginosa caída, llegando a 0 en la semana 9, cuando se produjo el aborto. La pérdida de la gestación en esta yegua se produjo demasiado pronto para registrar cambios en las concentraciones de sulfato de estrona. El producto muerto se reabsorbió sin ser expulsado, por lo que no fue posible realizar histopatología de placenta y producto.

La yegua “Flower” (figura 7.10) mantuvo concentraciones de eCG de aproximadamente 50 % de lo normal, a pesar de lo cual sus concentraciones de

progesterona fueron normales durante las primeras 8 semanas, reduciéndose posteriormente hasta llegar a 0 en la semana 10.5, cuando se produjo la muerte fetal. Sus concentraciones de sulfato de estrona nunca se elevaron, lo que pondría sugerir daño a la unidad feto-placentaria. Sin embargo no se encontraron cambios histopatológicos en la placenta ni en el producto.

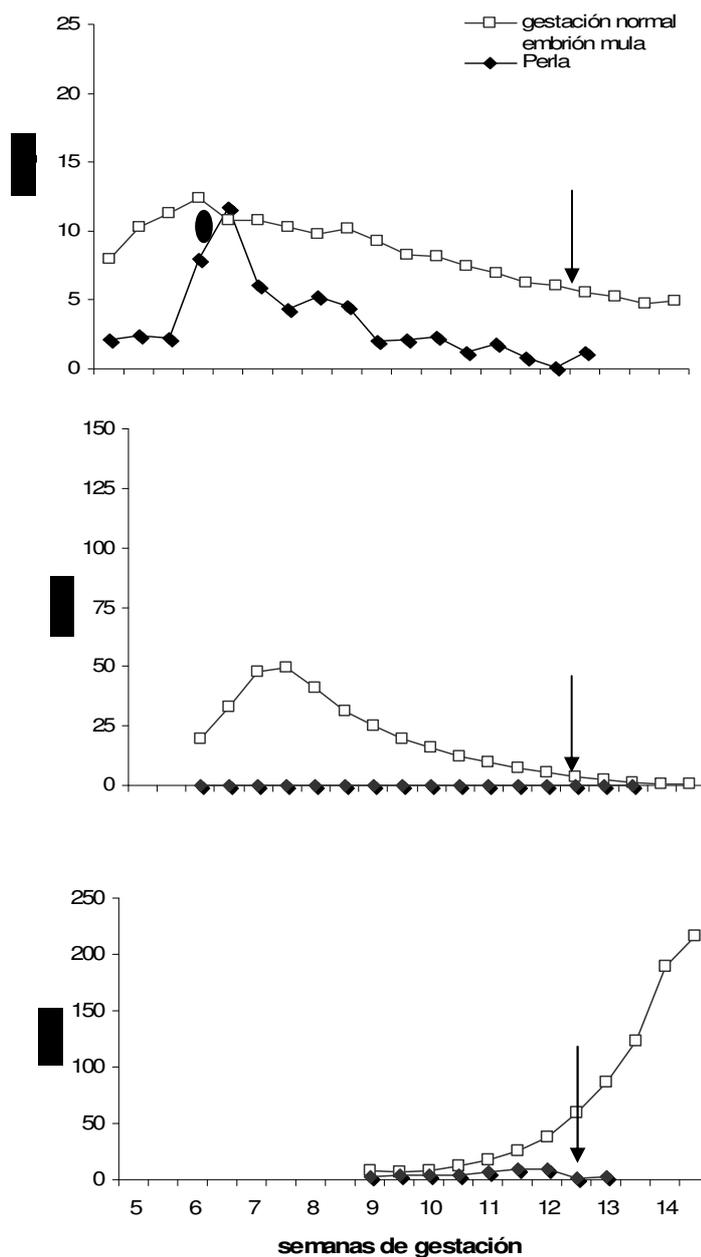


Figura 7.8 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión mula que sufrió aborto por deficiencia lútea asociada a ausencia de secreción de

eCG. Las flechas indican el momento en que se presentó la muerte fetal. El momento de formación de un cuerpo lúteo accesorio se indica con un óvalo negro.

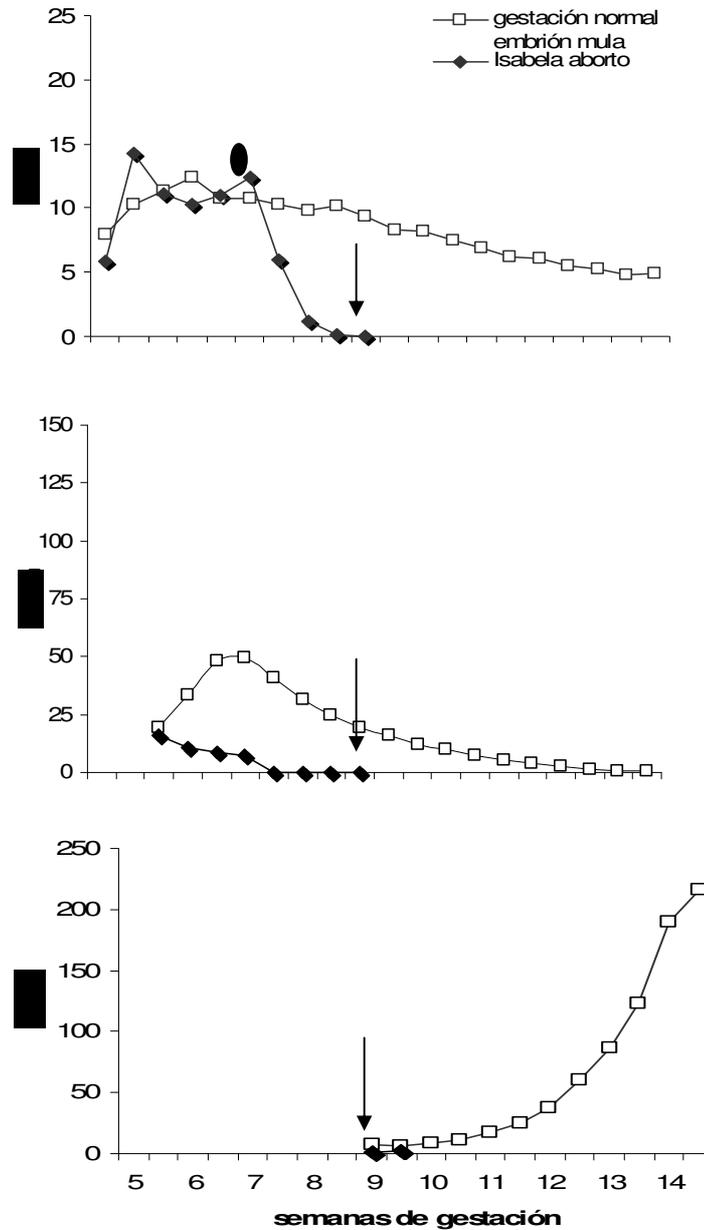


Figura 7.9 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión mula que sufrió aborto por deficiencia lútea asociada a deficiente secreción de eCG. Las flechas indican el momento en que se registró la muerte fetal. El momento de formación de un cuerpo lúteo accesorio se indica con un óvalo negro.

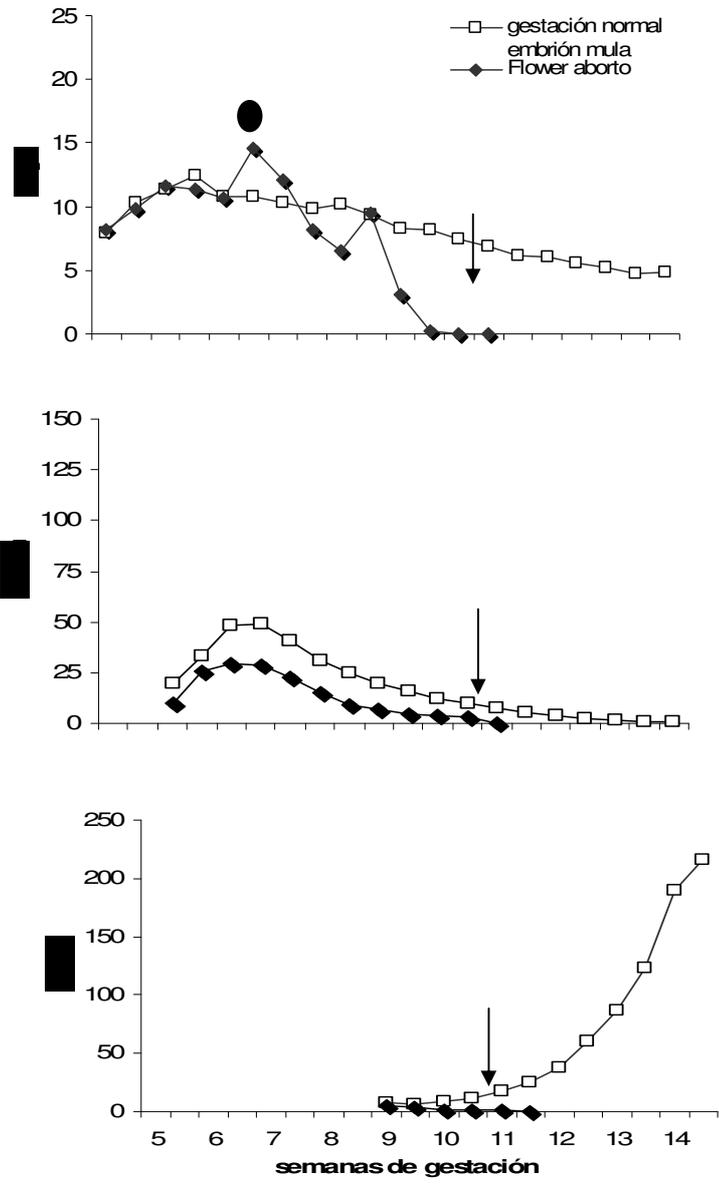


Figura 7.10 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión mula que sufrió aborto por deficiencia lútea asociada a una producción deficiente de eCG. Las flechas indican el momento en que se registró la muerte fetal. El óvalo negro indica el momento de formación de un cuerpo lúteo accesorio.

7.2.6.3 Yeguas con luteólisis activa que abortaron embriones mula

Dos yeguas servidas con burro que abortaron presentaron perfiles hormonales que sugieren la ocurrencia de un fenómeno de luteolisis activa (figuras 7.11 y 7.12).

La yegua “Beauty” (figura 7.11) presentó durante la mayor parte de la gestación concentraciones de progesterona más elevadas que el promedio encontrado en gestaciones normales de yegua servida con burro. Sin embargo, en la semana 14 se produjo una caída muy abrupta en las concentraciones de progesterona, que pasaron de 15 ng/ml en un muestreo a 0 ng/ml en el siguiente, momento en el que se detectó la muerte del producto. En esta yegua las concentraciones de eCG se mantuvieron siempre por encima del promedio para gestaciones normales de yeguas servidas con burro. Las concentraciones de sulfato de estrona se mantuvieron normales hasta la semana 13, cayendo bruscamente inmediatamente antes de la detección de la muerte del producto. Cabe destacar que la caída en las concentraciones de sulfato de estrona precedió por un muestreo a la caída en las concentraciones de progesterona, lo que sugiere un daño a la unidad feto-placentaria. Sin embargo no se encontraron cambios patológicos en la placenta ni en el feto abortado.

La yegua “Rubia” (figura 7.12) presentó un patrón similar al de la yegua descrita anteriormente. Sus concentraciones de progesterona se mantuvieron muy similares al promedio de gestaciones normales de yegua servida con burro hasta la semana 12, cuando se inició una repentina caída en las concentraciones de progesterona, que pasaron de 9 ng/ml a 0 ng/ml en una semana, lo que fue acompañado por la muerte del producto. Esta yegua había mantenido siempre concentraciones de eCG superiores al promedio para yeguas servidas con burro. Las concentraciones de sulfato de estrona cayeron en forma simultánea a la caída en las concentraciones de progesterona. No se encontraron cambios histopatológicos en la placenta ni en el feto abortado.

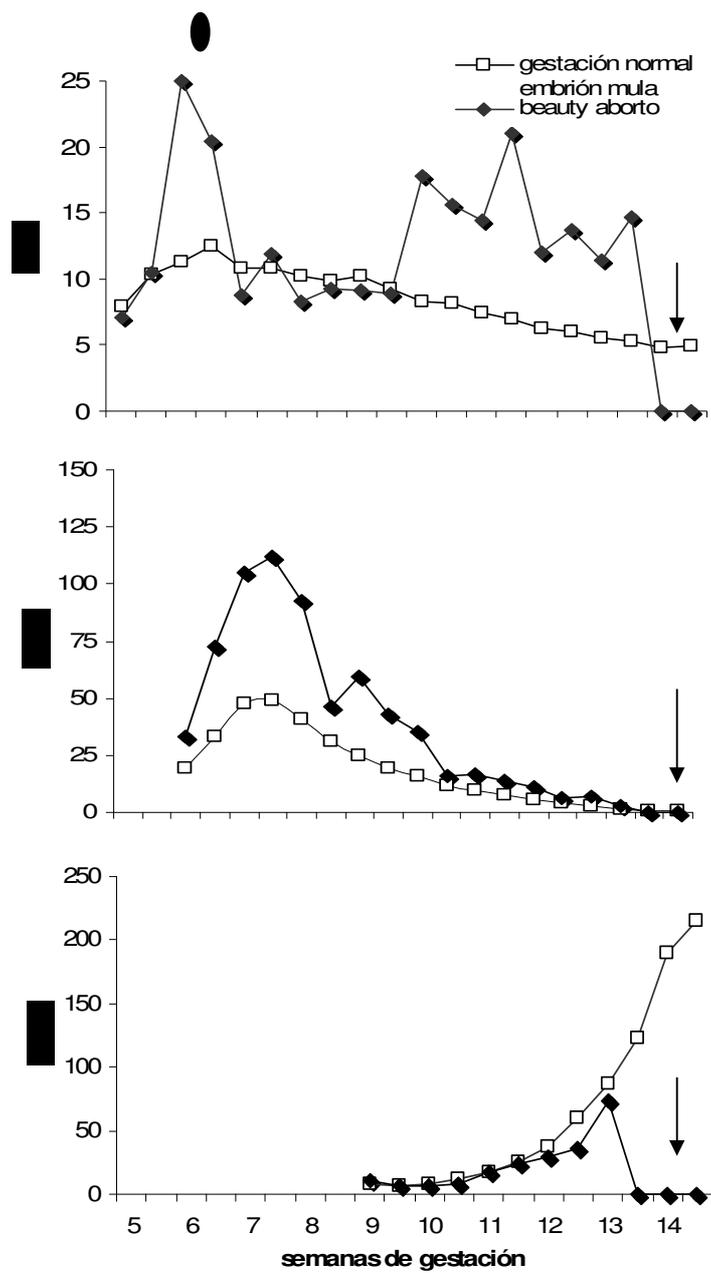


Figura 7.11 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en diferentes semanas de la gestación en una yegua con embrión mula que sufrió aborto por una lúteolisis activa. Las flechas indican el momento en que se registro la muerte del feto. El momento de la formación de un cuerpo lúteo accesorio es indicado con un óvalo negro.

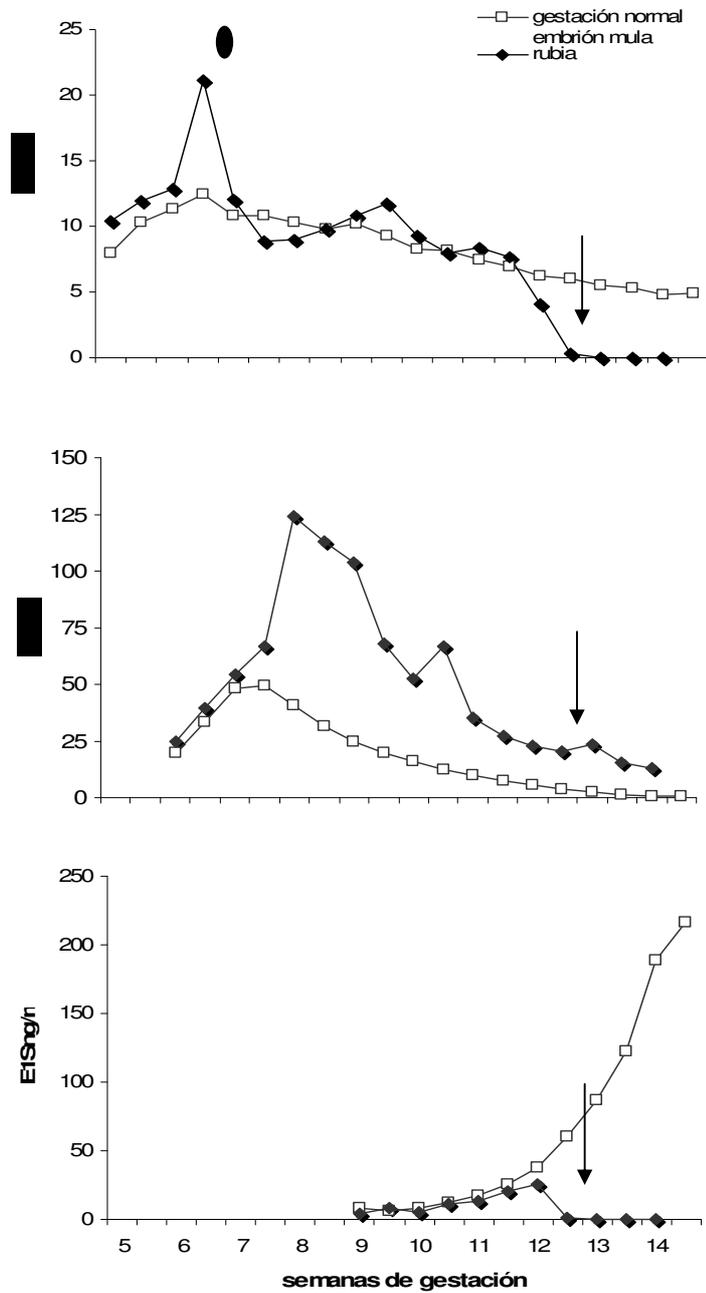


Figura 7.12 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en diferentes semanas de la gestación en una yegua con embrión mula que sufrió aborto por regresión del cuerpo lúteo. Las flechas indican el momento en que se registró la muerte del producto. El óvalo negro indica el momento en que se formó un cuerpo lúteo accesorio.

7.2.6.4 Yegua con combinación de deficiencia lútea primaria y luteólisis activa que abortó un embrión mula

La yegua “Lucía” (figura 7.13) mantuvo durante las primeras 8 semanas de la gestación niveles de progesterona de aproximadamente el 50% de los de las yeguas con gestaciones mulares normales. La deficiencia en la producción de progesterona durante las primeras 8 semanas se presentó a pesar de que las concentraciones de eCG fueron similares a las de las yeguas con gestación normal. Adicionalmente, en la semana 8.5 se produjo una abrupta caída en las concentraciones de progesterona, que pasaron de 4.5 ng/ml a 0 ng/ml entre un muestreo y el siguiente a pesar de que las revisiones ultrasonográficas indicaban que se acababa de formar un cuerpo lúteo accesorio. El aborto en esta yegua se presentó en forma muy temprana, por lo que no se determinaron las concentraciones de sulfato de estrona. El producto se reabsorbió sin ser expulsado, por lo que no se realizó histopatología.

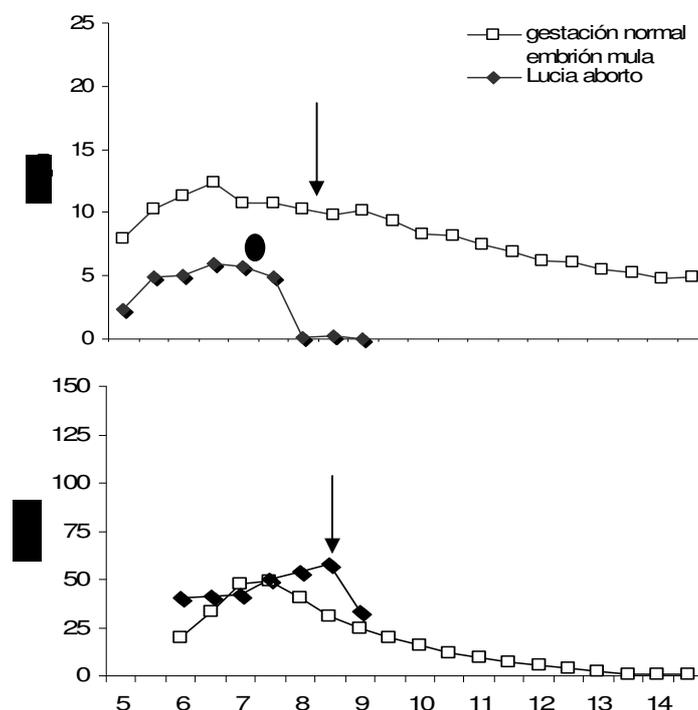


Figura 7.13 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión mula que sufrió aborto después de una deficiencia lútea primaria seguida por

lúteolisis repentina. Las flechas indican el momento en que se presentó la pérdida de la gestación. El óvalo negro indica el momento en el que se formó un cuerpo lúteo accesorio.

7.2.6.5 Yeguas con patología traumático-infecciosa que abortaron embriones mula.

En las yeguas servidas con burro se presentaron dos abortos en los que se encontraron cambios histopatológicos significativos en la placenta o en el producto.

La yegua “Marimbacha” (figura 7.14) mostró hasta la semana 12.5 patrones endocrinos similares a los de las yeguas con gestación mular normal, formando en la semana 7.5 un cuerpo lúteo accesorio. A partir de la semana 12.5 se inició una reducción gradual de las concentraciones de progesterona, que después de una semana y media llegaron a 0 ng/ml, coincidiendo con la muerte del producto. Las concentraciones de sulfato de estrona cayeron en forma dramática en el muestreo en el que se detectó la muerte del producto. Al estudio histopatológico se encontró hepatitis necrótica focal moderada en el feto.

La yegua “Lucero” (figura 7.15) presentó durante toda la gestación niveles muy bajos de eCG. Inicialmente presentó concentraciones relativamente bajas de progesterona que se elevaron entre la semana 7 y 8, cuando se formó un cuerpo lúteo accesorio. Posteriormente las concentraciones de progesterona se redujeron en forma marcada, permaneciendo en niveles de aproximadamente el 30 % de lo normal entre la semana 9 y la semana 12, cuando se registró la muerte del producto. Las concentraciones de sulfato de estrona nunca se elevaron. El estudio histopatológico reveló la presencia de placentitis asociado a una infección bacteriana. Como antecedente se debe señalar que la yegua sufrió una herida vulvar en la semana 8, la cual se infectó moderadamente.

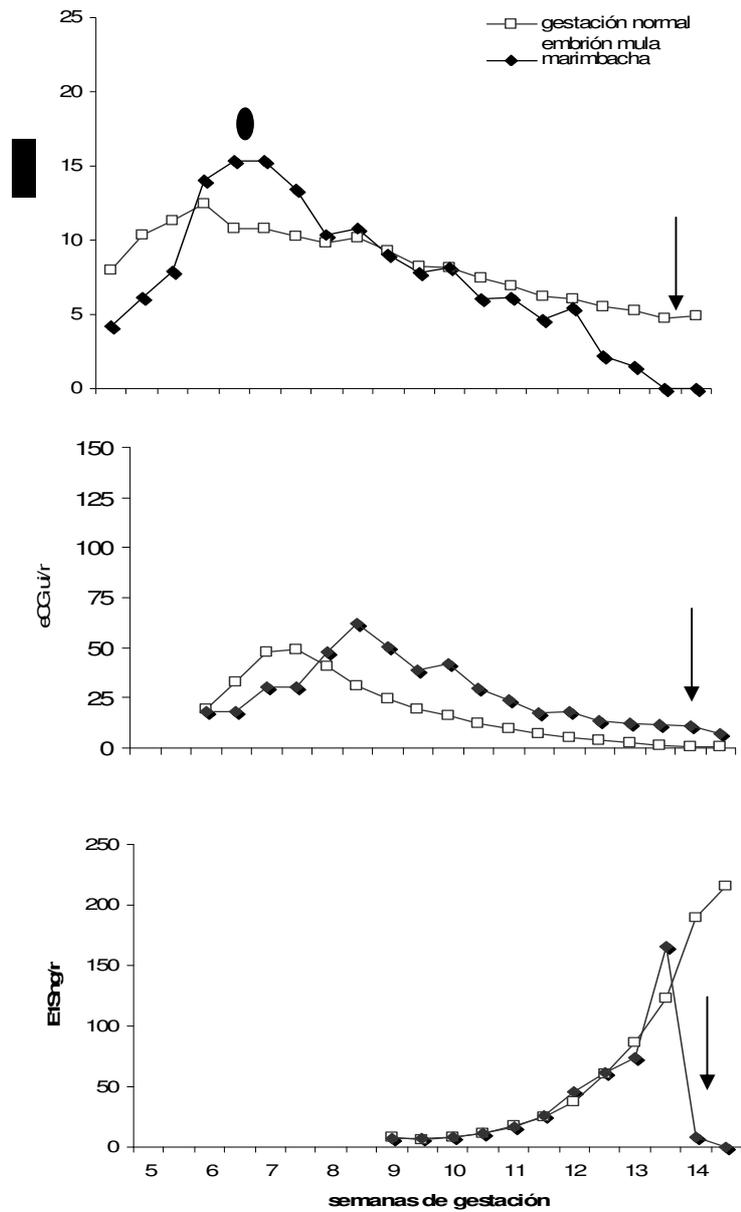


Figura 7.14 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión mula que sufrió muerte fetal sin presentar deficiencia de en la secreción de eCG. En el estudio histopatológico se encontró en el feto hepatitis necrótica focal moderada. Las flechas indican el momento en que se registró la muerte del producto. El óvalo negro indica el momento en que se formó un cuerpo lúteo accesorio.

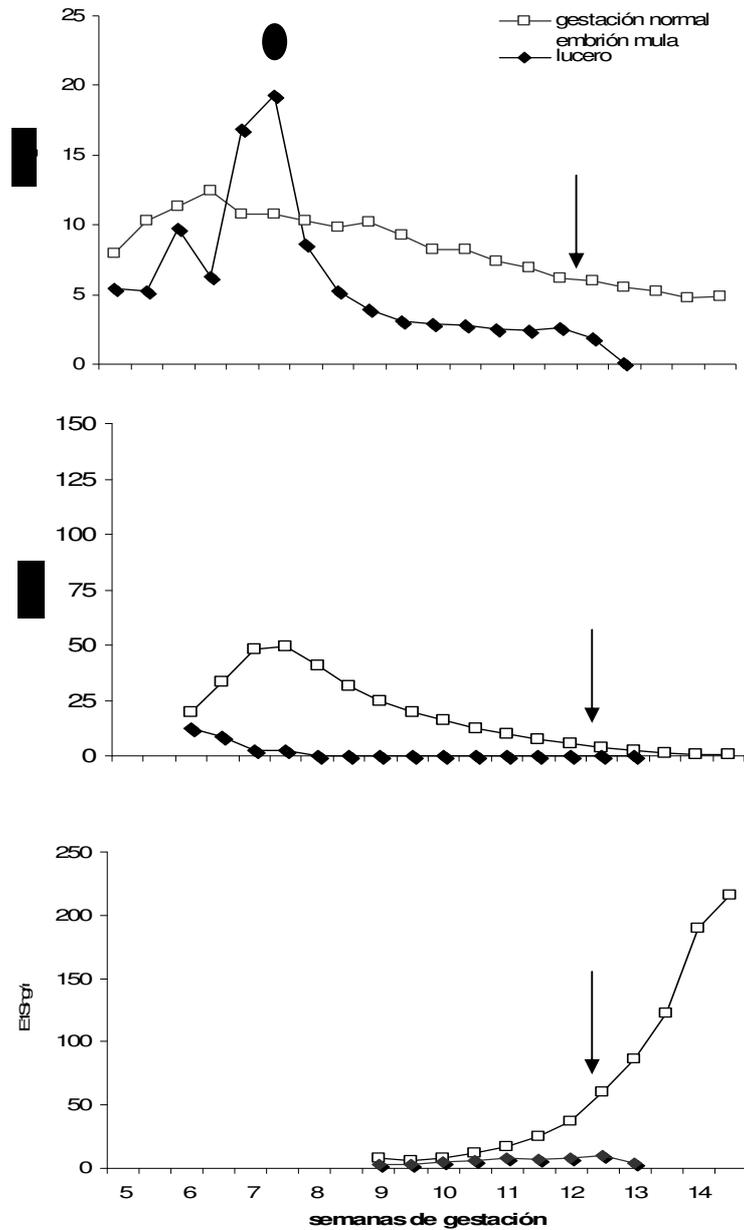


Figura 7.15 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión mula que sufrió muerte fetal después de un periodo de deficiencia lútea asociada con ausencia en la producción de eCG. La yegua además sufrió de placentitis con infección bacteriana posiblemente originada por una herida vulvar. Las flechas indican el momento en el que se produjo la muerte fetal. El óvalo negro indica el momento en el que se formó un cuerpo lúteo accesorio, que coincidió con la producción de una herida vulvar.

7.2.7. Descripción del caso de aborto en una yegua servida con caballo

Como ya se señaló, en las yeguas servidas con caballo se presentaron dos muertes embrionarias tempranas que ocurrieron antes de establecer el seguimiento periódico de las concentraciones hormonales. Adicionalmente se presentó un aborto cuyas características se describen a continuación.

La yegua “Rosario” (figura 7.16) presentó a lo largo de toda la gestación concentraciones de eCG muy por debajo de lo normal para gestaciones con embrión equino como el de ella, aunque superiores a las encontradas durante gestaciones normales con embrión mula. Las concentraciones de progesterona de esta yegua se mantuvieron casi siempre muy por debajo de lo normal para gestaciones con embrión equino e incluso por debajo del promedio para gestaciones con embrión mula. Entre las semanas 14 y 16 se produjo una gradual reducción en las concentraciones de progesterona hasta llegar a niveles basales. Las concentraciones de sulfato de estrona se elevaron ligeramente mas lento de lo normal entre las semanas 13 y 15 de la gestación, y cayeron abruptamente inmediatamente antes de registrarse la muerte fetal. En el estudio postmortem se encontraron alteraciones vasculares en la placenta que sugieren que el feto curso con síndrome de sufrimiento fetal por hipoxia. No se encontró evidencia de algún proceso inflamatorio.

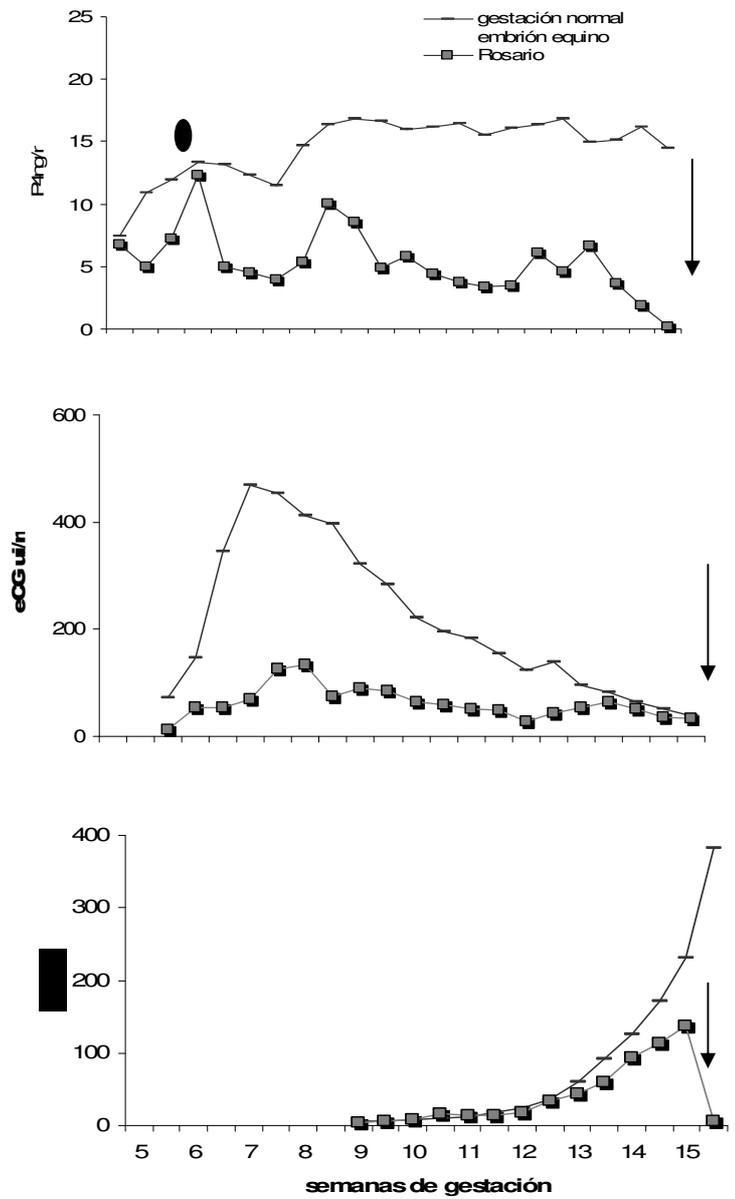


Figura 7.16 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión equino que sufrió aborto asociado con insuficiencia lútea primaria asociada con hipofunción placentaria y posible sufrimiento fetal. Las flechas indican el momento en que se registró la muerte fetal. El óvalo negro indica el momento de formación de un cuerpo lúteo accesorio.

7.2.8 Descripción de gestaciones normales con concentraciones bajas de progesterona y eCG

En esta sección se describen varios casos de yeguas que llevaron a término su gestación a pesar de tener concentraciones de progesterona y eCG considerablemente menores a las encontradas en el resto de las gestaciones normales de su propio tipo (embrión equino o embrión mula). En un intento de explorar los límites de compatibilidad de una gestación exitosa con bajos niveles hormonales los casos se presentarán iniciando con las deficiencias relativamente menores hasta las aparentemente muy drásticas.

La yegua “Rosario” , (figura 7.17) que había abortado durante el primer año del estudio (caso presentado en la figura 7.16), volvió a quedar gestante con embrión equino en el siguiente año, presentando otra vez una producción de eCG muy reducida para tratarse de una gestación con embrión equino (figura 7.17). Las concentraciones de progesterona también se mantuvieron siempre reducidas en relación al promedio de las gestaciones normales con embrión equino, aunque considerablemente más elevadas que en la gestación en la que esta misma yegua abortó. A diferencia de la gestación que terminó en aborto (figura 7.16), en la gestación exitosa (figura 7.17) las concentraciones de sulfato de estrona se mantuvieron dentro del promedio. El hecho de que esta yegua presentara en dos gestaciones sucesivas concentraciones bajas de eCG y progesterona sugiere que se trata de una yegua con incapacidad genética para producir elevados niveles de eCG.

La yegua “Candela” (figura 7.18) también se trata de un caso que a pesar de tener una gestación exitosa con embrión equino presentó concentraciones muy bajas de eCG acompañadas de concentraciones de progesterona de aproximadamente el 50% de las encontradas en las gestaciones normales con embrión equino. Esta yegua formó su primer y único cuerpo lúteo accesorio en forma tardía (semana 11)

Sus concentraciones de sulfato de estrona se mantuvieron rezagadas entre la semana 12 y la semana 15, recuperándose a partir de ese momento.

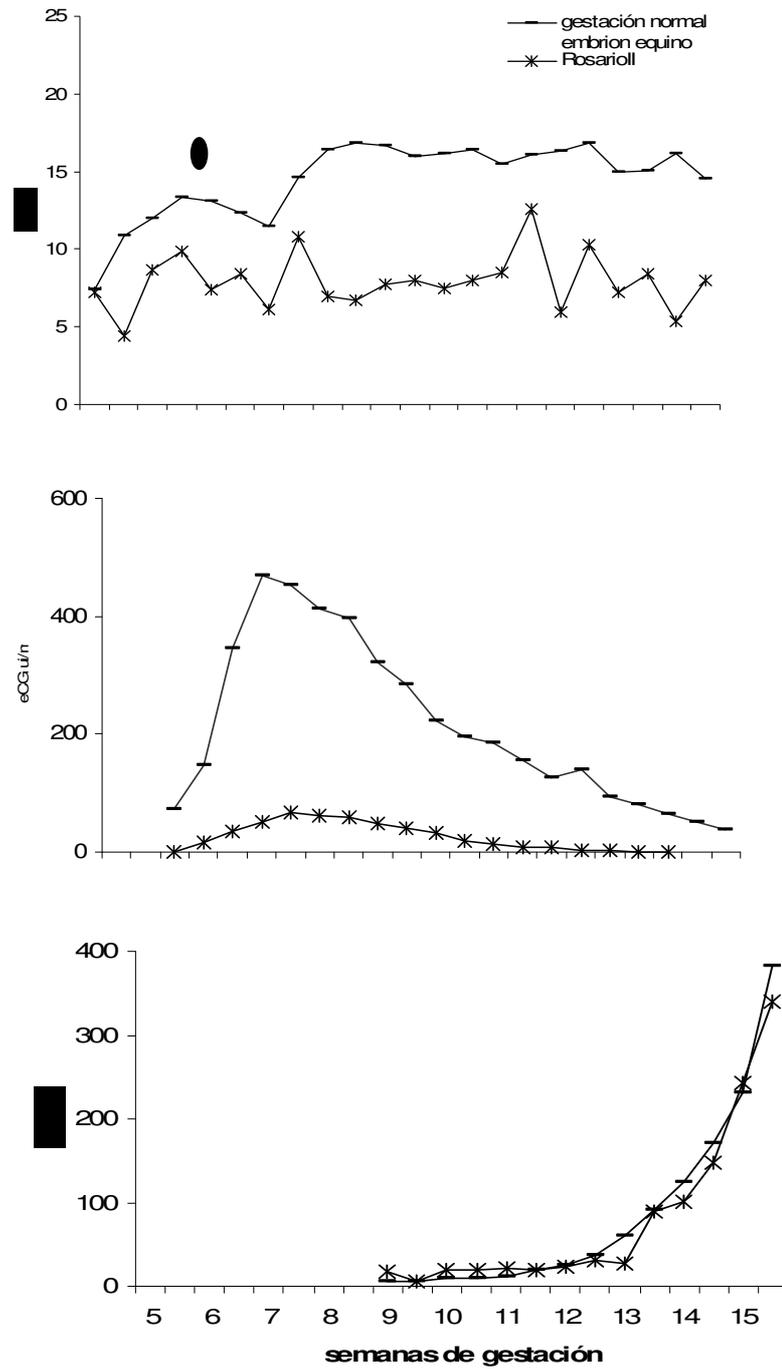


Figura 7.17 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con gestación exitosa de embrión equino a pesar de tener concentraciones reducidas de progesterona y eCG. El óvalo negro indica el momento en que se formó un cuerpo lúteo accesorio.

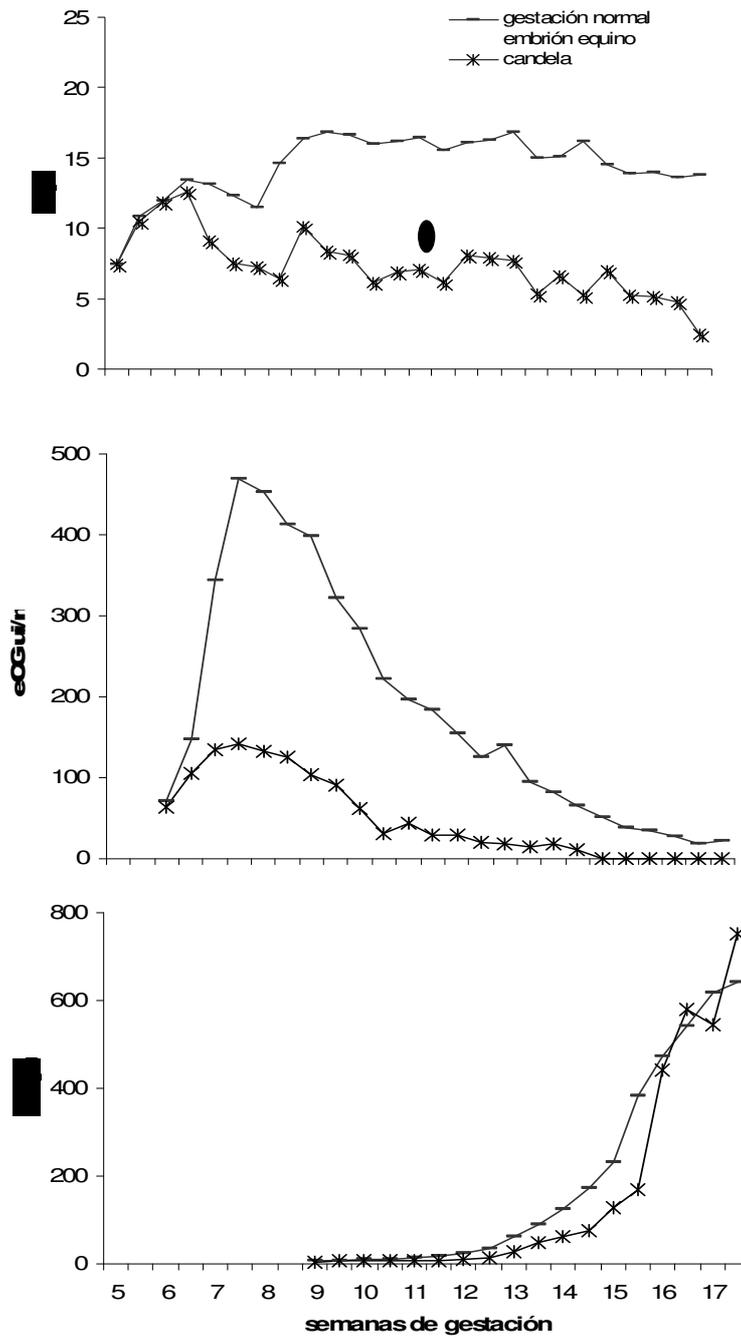


Figura 7.18 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con gestación exitosa de embrión equino a pesar de tener concentraciones reducidas de progesterona y eCG. El óvalo negro indica el momento en que se formó un cuerpo lúteo accesorio.

La yegua “Cariño” (figura 7.19) llevó a término en forma exitosa una gestación con embrión mula a pesar de que tanto sus concentraciones de eCG como las de progesterona se mantuvieron siempre muy por debajo del promedio de las concentraciones encontradas durante gestaciones normales con embrión mula. Las concentraciones de progesterona de esta yegua fueron ligeramente superiores a las de otras yeguas que abortaron por deficiencia lútea asociada a falta de secreción de eCG (figuras 7.7 y 7.8), por lo que el umbral de progesterona necesario para mantener la gestación puede ubicarse entre las concentraciones encontradas en la yegua “Cariño” y las encontradas en yeguas como las representadas en las figuras 7.7 y 7.8. Las concentraciones de sulfato de estrona en esta yegua fueron mayores que lo normal a partir de la semana 16, lo que sugiere que la producción de estrógenos por la unidad feto-placentaria no es dependiente de concentraciones elevadas de progesterona. Por otra parte, la ocurrencia de una ovulación accesoria en la semana 10, mucho tiempo después de que la eCG alcanzó niveles basales, pone en entredicho la necesidad de la eCG para inducir la ovulación.

La yegua “Marimbacha”, que había tenido un aborto asociado con una caída en las concentraciones de progesterona entre las semanas 12 y 14 de la gestación (presentada en la figura 7.14), volvió a quedar gestante al año siguiente con el mismo semental burro (figura 7.20). En esta ocasión la yegua volvió a presentar una profunda caída en sus concentraciones de progesterona, lo que ahora ocurrió entre las semanas 8 y 10, cuando llegaron a menos de 1 ng/ml y se mantuvieron así por al menos tres semanas antes de volver a elevarse. Sorprendentemente la yegua no abortó y llevó a término su gestación a pesar de que a partir de la semana 15 mantuvo una baja producción de sulfato de estrona. Una posible explicación de la no ocurrencia de aborto podría ser la producción de progestágenos (no detectables como progesterona) a nivel placentario, lo que podría estar apoyado por la elevación relativa en la producción de secreción de sulfato de estrona entre las semanas 11 y 13. Cabe destacar que también la yegua “Cariño” (presentada en la figura 7.19) mantuvo una elevada producción de

sulfato de estrona asociada con el mantenimiento de la gestación a pesar de tener bajas concentraciones circulantes de progesterona.

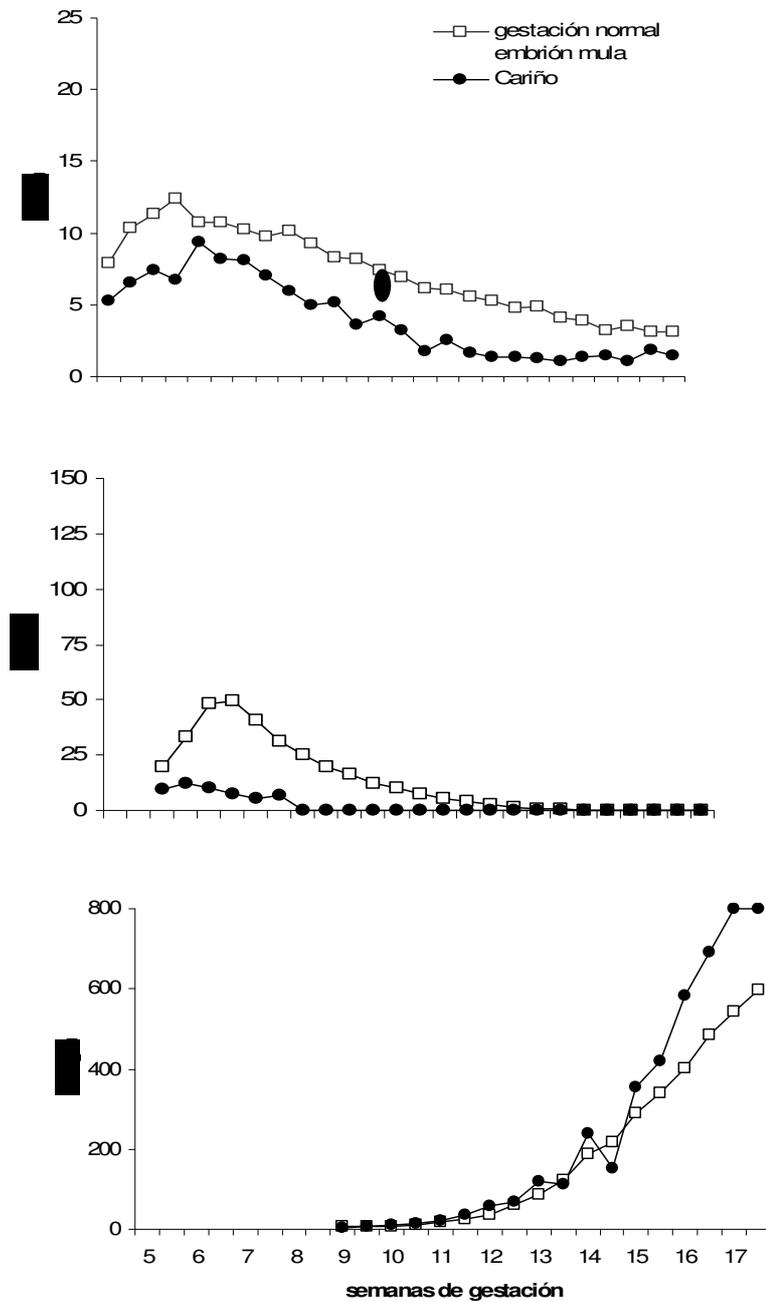


Figura 7.19 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión mula que presentó una gestación normal a pesar de presentar bajas concentraciones de progesterona y eCG durante el estudio. El óvalo negro indica el momento en que se formó un cuerpo lúteo accesorio.

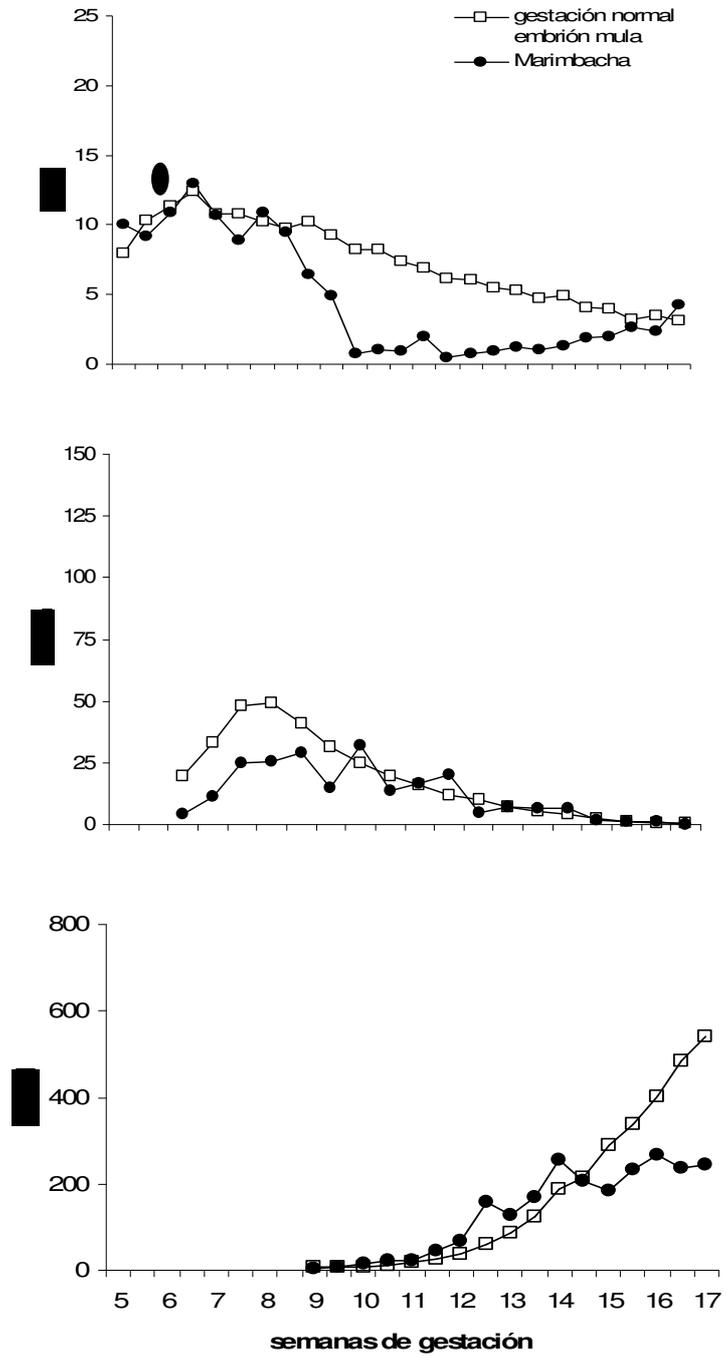


Figura 7.20 Concentraciones de progesterona, eCG y sulfato de estrona en una yegua con embrión mula que presentó una gestación normal a pesar de tener niveles sumamente bajos de progesterona y bajos niveles de eCG. El óvalo negro indica el momento en el que se formó un cuerpo lúteo accesorio.

7.3 DISCUSIÓN

7.3.1 Perfiles hormonales y formación de cuerpos lúteos accesorios en gestaciones normales.

Los perfiles de progesterona y eCG encontrados en el presente trabajo en gestaciones normales de yeguas servidas con caballo coinciden con lo encontrado por otros autores, (Kindhal, 1982, Squires, 1993 Allen y Stewart, 1993; Allen, 2001), lo que también es el caso con los perfiles de yeguas servidas con burro. (Allen 1984, Allen y Stewart 1993; Boeta y Zarco, 2005). La deficiente función lútea y la rápida regresión de las copas endometriales entre la semana 7^a y 11^a en yeguas gestantes con embrión mula han sido reportadas anteriormente y se deben al rechazo prematuro que el sistema inmunológico de la yegua desencadena en contra de las copas endometriales formadas a partir de células coriónicas de embriones mula (Bergfelt et al, 1989; Allen et al, 1987; Allen, 2001b).

7.3.1.1 Efecto de la época del año

En el presente trabajo no se encontraron diferencias entre épocas del año con respecto a los perfiles hormonales de las yeguas servidas con burro o de las yeguas servidas con caballo que tuvieron gestaciones normales.

La falta de efecto de la época del año sobre la secreción de eCG era de esperarse debido a que esta hormona placentaria se secreta en forma constitutiva y no está sujeta a regulación por parte del eje hipotálamo-hipofisario (Manning et al, 1987; Allen, 1984; Allen y Stewartt, 1993; Roser, 1999). Tampoco se esperaban efectos de la época sobre los perfiles de sulfato de estrona, ya que esta hormona se produce principalmente mediante una colaboración entre las gónadas fetales, el hígado del feto y la placenta (Terqui y Palmer, 1997; Strauss et al, 1996; Albrecht et al, 1997; Saint-Dizier et al, 2004), sin participación del eje hipotálamo-hipofisario de la madre.

En cambio, si se esperaba encontrar efectos de la época del año sobre la secreción de progesterona, especialmente en las yeguas servidas con burro, en las que la casi total ausencia de eCG (Boeta y Zarco, 2005) nos había hecho sugerir que la función lútea durante la gestación podría depender principalmente de las gonadotropinas secretadas por la hipófisis materna, cuyos patrones de secreción son fuertemente influenciados por la época del año (Palmer et al, 1982; Sharp, 1988; Ginther et al, 2005; Donadeu y Watson, 2007). La capacidad del cuerpo lúteo de la gestación para continuar funcionando con el apoyo de LH hipofisiaria en ausencia total de eCG fue demostrada por Allen et al. (1987), quienes reportaron que en gestaciones xenogénicas carentes de eCG el cuerpo lúteo primario continua funcionando bajo el estímulo de LH hipofisiaria, y que la supresión de la secreción de esta hormona mediante la retroalimentación negativa con progestágenos sintéticos resulta en una pérdida inmediata de la función lútea.

Algunos factores que pueden explicar la falta de efecto de la época del año sobre la función lútea en yeguas servidas con burro en el presente trabajo son los siguientes:

1- La inhibición de la secreción de LH durante la época anovulatoria de la yegua podría ser menos marcada que la inducida mediante retroalimentación negativa con progestágenos, lo que permitiría que hubiese una secreción basal de LH en cantidad suficiente para sostener la actividad del cuerpo lúteo. Esta posibilidad es apoyada por el hecho de que se encontró una yegua que quedó gestante con embrión mula al final de la época reproductiva, y que presentó dos ovulaciones accesorias en total ausencia de eCG (figura 7.21), lo que solamente podría ocurrir si hubiese existido la secreción de cantidades adecuadas de LH.

2- Las concentraciones de eCG en gestaciones con embrión mula, aunque muy reducidas y en ocasiones prácticamente indetectables, son superiores a la nula secreción encontrada cuando se transfieren embriones de burro a yeguas (Allen et al, 1993a; 1993b), por lo que podrían ser suficientes para mantener una función lútea basal, que no dependería de la secreción materna de LH. La dependencia a la LH

del cuerpo lúteo de la gestación de yeguas servidas con burro (embrión mula) podría ser evaluada mediante la administración de un progestágeno sintético para determinar si la retroalimentación negativa sobre la LH resulta en una pérdida de la función lútea similar a la que ocurre en yeguas gestantes con embrión burro.

3.- La época del año en que transcurrieron el segundo y tercer mes de la gestación en las yeguas utilizadas en el presente trabajo (agosto y septiembre) puede haber coincidido con la época de transición hacia la época anovulatoria, más que con un periodo de profunda inhibición, por lo que por lo menos algunas yeguas podrían haber estado aún en un periodo de secreción normal de LH.

7.3.1.2 Diferencias en las concentraciones hormonales y formación de cuerpos lúteos accesorios en yeguas servidas con burro y yeguas servidas con caballo con gestaciones normales.

Debido a la falta de efecto de la época del año sobre las concentraciones hormonales se calcularon los perfiles promedio de cada hormona para todas las gestaciones normales de cada tipo de yegua (servidas con caballo o servidas con burro), sin diferenciar entre la época de gestación de cada animal. Se encontró que las concentraciones de progesterona fueron muy similares en ambos tipos de yeguas hasta la semana 8 de la gestación, aumentando a partir de ese momento en las yeguas servidas con caballo pero no en las servidas con burro, por lo que las concentraciones de progesterona en éstas últimas fueron significativamente ($p < 0.01$) menores que las de yeguas servidas con caballo a partir de la semana 9 y hasta la conclusión del estudio (figura 7.1). En el caso de la eCG, las concentraciones en las yeguas servidas con caballo fueron significativamente mayores que las de las yeguas servidas con burro desde la semana 6.5 hasta la semana 14 (figura 7.2). Estas diferencias en los perfiles hormonales en función del tipo de embrión que lleve la yegua confirman los hallazgos previos de Boeta y Zarco (2005). Por otra parte, las concentraciones de sulfato de estrona fueron siempre muy similares en yeguas servidas con caballo y yeguas servidas con burro (figura 7.3), lo que parecería indicar

que la reducida producción de progesterona y eCG en las yeguas servidas con burro no afecta el desarrollo ni la función de la unidad feto placentaria, por lo menos hasta la semana 17 de la gestación. Hasta donde sabemos nunca se habían comparado las concentraciones de sulfato de estrona durante gestaciones normales de yeguas servidas con caballo y yeguas servidas con burro, sin embargo, Boeta y Zarco (2005) habían demostrado que el ritmo de crecimiento de la vesícula embrionaria durante los primeros días de la gestación es muy similar en ambos tipos de yegua, lo que soporta la hipótesis de que las concentraciones de progesterona en yeguas servidas con burro alcanzan un nivel umbral suficiente para permitir el desarrollo normal del producto.

7.3.1.3 Relación entre eCG, progesterona y formación de cuerpos lúteos accesorios

Es evidente que las diferencias en las concentraciones de progesterona entre ambos tipos de yeguas se deben en gran medida a las diferencias en las concentraciones de eCG, ya que existió una correlación altamente significativa ($p < 0.01$) entre las concentraciones de ambas hormonas. El efecto de la eCG no fue exclusivamente un efecto de estimulación a los cuerpos lúteos existentes, sino que fue mediado en gran parte por la estimulación de la formación de cuerpos lúteos accesorios. Así, en el caso de las gestaciones con embrión equino las concentraciones de progesterona se elevaron en forma bifásica, registrándose una primera elevación entre la semana 5 y la semana 7 (figura 7.1), que corresponde con la elevación inicial de las concentraciones de eCG (figura 7.2) y con la formación del primer cuerpo lúteo accesorio en todas las yeguas (semana 6.7 ± 0.4 ; primera flecha en la figura 7.6). Entre la semana 7 y 8 las concentraciones de progesterona se estabilizaron, lo que podría indicar que el cuerpo lúteo de la gestación y el primer cuerpo lúteo accesorio alcanzaron su máximo nivel funcional en respuesta a concentraciones también máximas de eCG. Este patrón bifásico de secreción de progesterona asociado a la secreción de eCG y la formación de cuerpos lúteos accesorios ha sido descrito por

otros autores (Allen, 1984; Bergfelt et al, 1989; Daels *et al.*, 1995; Boeta y Zarco, 2005).

Posteriormente, en el presente trabajo se produjo una elevación adicional en las concentraciones promedio de progesterona entre la semana 8 y la semana 10 (figura 7.1), lo que se debió fundamentalmente a la ocurrencia de nuevas ovulaciones y la formación de nuevos cuerpos lúteos accesorios durante ese periodo en la mayoría de las yeguas. Así, en la figura 7.6 se muestra que esta segunda elevación en las concentraciones de progesterona solamente se produjo en las 10 yeguas que formaron un segundo cuerpo lúteo accesorio (grupos 3 CL y 4 CL), ocurriendo inmediatamente después de la formación de esta estructura (segunda flecha en la figura 7.6). Estos 2 grupos de yeguas tuvieron concentraciones de eCG significativamente más elevadas durante las semanas 8 y 9 que las yeguas que no llegaron a formar un segundo cuerpo lúteo accesorio (figura 7.6), lo que probablemente fue fundamental para que se produjera la segunda ovulación accesoria. Un grupo de 4 yeguas servidas con caballo presentaron una tercera ovulación accesoria, por lo que llegaron a tener 4 CL, (figura 7.5). La formación de éste tercer cuerpo lúteo accesorio ocurrió en promedio en la semana 10.4 ± 0.4 , y posiblemente se debió a que entre la semana 9 y la semana 11 las concentraciones de eCG en ese grupo de yeguas eran de casi el doble ($p < 0.01$) que las encontradas en las demás yeguas (figura 7.6). Cabe destacar que la elevación en las concentraciones de progesterona que ocurrió después de la formación del tercer cuerpo lúteo accesorio en las yeguas del grupo 4CL fue de pequeña magnitud. Sin embargo contrasta profundamente con la reducción en las concentraciones de progesterona que se produjo en las demás yeguas a partir de la semana 11, lo que provocó que las concentraciones de progesterona fueran significativamente mayores ($p < 0.05$) en el grupo 4CL que en los otros grupos desde la semana 13 hasta el final del estudio.

En el caso de las yeguas servidas con burro la relación entre concentraciones de eCG, formación de cuerpos lúteos accesorios y concentraciones de progesterona es

menos clara pero sigue existiendo. Así, entre la semana 5 y 6.5 se registró un incremento en las concentraciones de progesterona (figura 7.1) que coincidió con la pequeña elevación en las concentraciones de eCG registrada en este tipo de gestación (figura 7.2) y con la formación de un cuerpo lúteo accesorio en todas las yeguas (primera flecha en la figura 7.6bis). Es interesante mencionar que entre la semana 5 y la semana 8 las concentraciones de progesterona fueron muy similares en las yeguas servidas con caballo y en las yeguas servidas con burro (figura 7.1) a pesar de que las concentraciones de eCG fueron mucho menores en éstas últimas (figura 7.2). Esto sugiere que las concentraciones de eCG entre la semana 5 y 8 en las yeguas servidas con burro alcanzan en esta etapa de la gestación el nivel umbral necesario para lograr la inducción de una ovulación accesoria y la estimulación de los cuerpos lúteos, y es solamente después de la semana 8 de la gestación cuando las concentraciones de eCG son insuficientes en las yeguas servidas con burro, lo que se refleja a partir de este momento en la divergencia entre las curvas de progesterona de las yeguas servidas con burro y las yeguas servidas con caballo. Cabe mencionar que estos resultados no coinciden con lo informado por Allen (1987), quien trabajando con yeguas servidas con burro no encontró la formación de cuerpos lúteos secundarios ni la elevación de las concentraciones de progesterona observada en el presente trabajo entre las semanas 5 y 8. Sin embargo en el presente trabajo se realizó el seguimiento de un número de gestaciones con embrión mula mucho mayor al realizado por Allen (1987).

En la figura 7.6bis se observa que las concentraciones de eCG y progesterona de las 4 yeguas servidas con burro que formaron un segundo cuerpo lúteo accesorio (grupo 3CL) no fueron distintas de las de las yeguas que solo formaron un cuerpo lúteo accesorio (grupo 2CL). La falta de diferencia en las concentraciones de eCG podría indicar que después de la semana 8 de gestación la ocurrencia o no de ovulación en yeguas servidas con burro podría deberse más a diferencias en la sensibilidad a la eCG que a diferencias en los niveles de esta hormona. Alternativamente, la ocurrencia o no de ovulación podría deberse a la presencia o ausencia de secreción de LH hipofisiaria en cantidad suficiente para inducir la ovulación, lo que explicaría la

ocurrencia de alguna ovulaciones accesorias en las semanas 10 u 11, cuando las concentraciones de eCG casi habían alcanzado niveles basales (figura 7.6 bis), e inclusive la presencia de 2 ovulaciones accesorias en una yegua que había tenido ausencia total de eCG durante varias semanas previas (figura 7.21)

Por otra parte, la falta de diferencia en las concentraciones de progesterona en yeguas con 2 CL y yeguas con 3 CL (figura 7.6 bis) parecería soportar la hipótesis de que en yeguas servidas con burro la estimulación de la función lútea podría estar dada por la LH hipofisiaria, lo que a través de los mecanismos de retroalimentación propios del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Nagy et al, 200; Ginther et al, 2005) permitiría que las concentraciones circulantes de progesterona fuesen similares independientemente del número de cuerpos lúteos presentes. En las yeguas servidas con burro solamente hubo una gestación en la que se formaron 3 cuerpos lúteos accesorios, por lo que la yegua llegó a tener 4CL. Debido a que se trata de una sola yegua no es posible comparar estadísticamente sus perfiles hormonales contra los de otros grupos de yeguas, pero no puede dejar de mencionarse que esta yegua tuvo concentraciones de eCG muy por encima de las alcanzadas por las otras yeguas servidas con burro, y que sus concentraciones de progesterona a partir de su última ovulación también fueron muy superiores a las alcanzadas por otras yeguas con este tipo de gestación.

7.3.2 Mortalidad embrionaria y fetal

7.3.2.1 Efecto de la época del año

En los cuadros 7.1, 7.2 y 7.3 puede observarse que no se encontraron diferencias entre épocas del año con respecto a las pérdidas de gestación en yeguas servidas con burro o con caballo, a pesar de que en las yeguas que quedaron gestantes al inicio de la época reproductiva (abril), la primera mitad de la gestación transcurrió en plena época reproductiva, cuando las concentraciones de LH están elevadas

(Sharp,1988; Ginther y Gastal 2005), mientras que en las yeguas que quedaron gestantes en el verano la primera mitad de la gestación transcurrió cuando las concentraciones de LH se reducen debido a que la yegua entra en época anovulatoria (Sharp, 1988;). Esta falta de efecto de la época del año era de esperarse en el caso de las yeguas servidas con caballo, cuya producción de altas concentraciones de eCG (Boeta y Zarco, 2005) garantizaría la vitalidad de los cuerpos lúteos de la gestación aún en la época del año en que la secreción de LH está inhibida. En cambio, en el caso de las yeguas servidas con burro los resultados del trabajo no concuerdan con nuestra hipótesis de trabajo, que postulaba que al no contar con niveles adecuados de eCG, las yeguas gestantes con burro en la época en que la secreción de LH está reducida tendrían mayores dificultades para mantener la gestación.

7.3.2.2. Diferencias en mortalidad embrionaria y fetal entre yeguas servidas con caballo y yeguas servidas con burro.

En el cuadro 7.1 se observa que la incidencia de mortalidad embrionaria (antes del día 40 de la gestación) en yeguas servidas con burro (6.2 %) no fue diferente ($P>0.05$) a la de yeguas servidas con caballo (9.1 %). Esta falta de diferencia en cuanto a mortalidad embrionaria ya había sido observada por Boeta y Zarco (2005), y es de esperarse debido a que las concentraciones de progesterona en ambos tipos de gestación son muy similares hasta ella semana 8 de la gestación (figura 7.1), y solamente comienzan a separarse en etapas posteriores. La incidencia de mortalidad embrionaria fue similar a la encontrada por Boeta y Zarco (2005) e inferior a la informada por Vanderwall y Newcombe (2007), aunque debe tomarse en cuenta que Vanderwall y Newcombe (2007) iniciaron su seguimiento a partir de diagnósticos más tempranos de gestación, por lo que tuvieron mayor oportunidad de registrar muertes embrionarias muy tempranas. Ellos informaron que la mayor parte de las muertes embrionarias se produjeron entre el día 15 y el día 20 de la gestación, es decir antes de que se iniciara el seguimiento en el presente trabajo.

El caso de la mortalidad fetal (después del día 40 de la gestación) es diferente, ya que al igual que en los trabajos de Allen (1984) y de Boeta y Zarco (2005), en el presente trabajo la incidencia en yeguas servidas con burro (30 %) fue significativamente mayor ($P < 0.05$) que la de yeguas servidas con caballo (5 %) (Cuadro 7.2). Esta última fue similar a la encontrada previamente por otros autores en yeguas servidas con caballo (Carnevale y Ginther, 1995). Solamente un caso de muerte fetal en yegua servida con burro (figura 7.13) ocurrió en una etapa de la gestación en la que las concentraciones de progesterona de las yeguas servidas con caballo y las de las yeguas servidas con burro son similares. Los demás casos de muerte fetal en yeguas servidas con burro ocurrieron en promedio en el día 81 ± 4 de la gestación, etapa en que las concentraciones de progesterona (figura 7.1) y eCG (figura 7.2) durante gestaciones normales de yeguas servidas con burro fueron muy inferiores ($p < 0.01$) a las de las yeguas servidas con caballo. Tanto Allen (1987) como Boeta y Zarco (2005) también encontraron la mayor incidencia de muerte fetal al final del tercer mes de gestación en yeguas servidas con burro. Como se verá en la siguiente sección, la mayoría de los casos de muerte fetal parecen estar relacionados en mayor o menor medida con una deficiencia aún mayor de progesterona durante los días o semanas previos al aborto.

Como resultado de la mayor incidencia de mortalidad fetal, la incidencia total de pérdidas de gestación de las yeguas servidas con burro fue casi del triple (34.3%) que la de las yeguas servidas con caballo (13.6 %). Aunque la diferencia no llegó a ser significativa ($p > 0.05$), confirma lo observado en estudios previos (Allen, 1984; Boeta y Zarco, 2005) y es sin duda una de las causas principales del bajo índice de parición anual observado en hatos de yeguas dedicados a la producción de mulas (Jordao et al, 1954).

En el presente trabajo el aborto en yeguas servidas con burro ocurrió en promedio en el día 81 ± 4 de la gestación

7.3.2.3 Análisis de las causas de mortalidad fetal

Como se resume en el cuadro 7.4, la mayor parte de los abortos en yeguas servidas con burro estuvieron asociados con una deficiencia de un tipo u otro en la producción de progesterona. Así, un aborto estuvo asociado con concentraciones excesivamente bajas de progesterona a pesar de tener concentraciones de eCG similares a las yeguas servidas con burro que tuvieron gestación normal (Insuficiencia lútea primaria, figura 7.7); tres abortos ocurrieron en yeguas con concentraciones bajas de progesterona a su vez asociadas con muy baja o nula producción de eCG (Insuficiencia lútea secundaria, figuras 7.8 a 7.10); en otras 2 yeguas las concentraciones de progesterona disminuyeron abruptamente inmediatamente antes de la muerte del feto, posiblemente a causa de una luteolisis por secreción activa de $\text{PGF2}\alpha$ (figuras 7.11 y 7.12). Otra yegua (figura 7.13) mostró perfiles hormonales compatibles tanto con una insuficiencia lútea primaria como con luteolisis activa; finalmente, las muertes fetales ocurridas en las últimas dos yeguas (figuras 7.14 y 7.15), aunque involucraron componentes traumático/infecciosos, también estuvo asociada con concentraciones inapropiadas de progesterona. A diferencia del estudio de Boeta y Zarco (2005), en el presente trabajo no se encontraron casos de muerte fetal repentina sin evidencia de alteraciones endocrinas.

La deficiencia lútea primaria como causa de muerte fetal ya había sido encontrada por Boeta y Zarco (2005) en una yegua servida con caballo. En el presente trabajo se encontró una yegua servida con burro que también mostró una marcada insuficiencia lútea a partir de la semana 8 de la gestación a pesar de que su producción de eCG era ligeramente superior a la de las yeguas con gestación normal de embrión mula (figura 7.7). Después de 3 semanas de una deficiente función lútea se produjo la muerte del producto. Cabe destacar que este no fue el único caso de insuficiencia lútea primaria, pues otra yegua servida con burro (figura 7.13) también mantuvo una deficiente producción de progesterona, en este caso desde que se iniciaron los muestreos, a pesar de tener concentraciones normales de eCG. Esta yegua terminó

abortando debido a un aparente proceso de luteolisis activa, que sin embargo no niega el hecho de que desde semanas antes existía una insuficiencia lútea primaria. En forma similar, una yegua servida con caballo (“Rosario”) también abortó después de 10 semanas de mantener concentraciones de progesterona mucho menores que las encontradas en gestaciones normales de yegua con caballo e incluso menores que las encontradas en gestaciones normales de yeguas servidas con burro (figura 7.16). Aunque las concentraciones de eCG en esta yegua fueron menores a las encontradas durante gestaciones normales de yeguas servidas con caballo, fueron superiores a las de gestaciones normales de yeguas servidas con burro, por lo que podría caracterizarse como un caso de insuficiencia lútea primaria. En la placenta de esta yegua se encontraron alteraciones vasculares que podrían ser debidas a la insuficiencia crónica de progesterona, y que a juzgar por las concentraciones circulantes de sulfato de estrona al parecer afectaron el desarrollo y/o bienestar del feto durante las dos semanas previas a su muerte. Es difícil conocer las causas de la insuficiencia lútea primaria; podría tener su origen tanto en una defectuosa formación y/o vascularización del cuerpo lúteo, como en una relativa insensibilidad a la LH/eCG. Podría incluso tener un componente genético, ya que en el presente trabajo se siguió a la yegua “Rosario” durante una gestación subsecuente, encontrándose una vez más una hipofunción lútea (figura 7.17), aunque no tan marcada como la registrada durante su gestación anterior.

La insuficiencia lútea secundaria a deficiencia de eCG como causa de aborto en yeguas servidas con burro había sido descrita antes en un solo caso de aborto en una yegua servida con caballo que aparentemente no es capaz de producir eCG (Boeta y Zarco, 2005). Los tres casos encontrados en el presente trabajo variaron desde una total ausencia de eCG acompañada por insuficiencia lútea durante varias semanas antes de producirse el aborto (figura 7.8), hasta una producción reducida de eCG (menos de 30 UI/ml) acompañada por una disminución muy gradual pero completa de la función lútea (figura 7.10), así como un caso intermedio con una muy breve secreción de eCG seguida por regresión lútea (figura 7.9). Las causas de la falla en la secreción de eCG no se conocen con precisión, aunque parece haber un

componente genético, ya que se han detectado yeguas que en gestaciones repetidas no producen eCG (Manning et al, 1987; Boeta y Zarco, 2005).

Por otra parte, la deficiente o nula producción de eCG no siempre resultó en aborto. Así, las yeguas “Cariño” (figura 7.19), “Candela” (figura 7.21), “Rubia” (figura en anexo 7.5.3) y “Gitana” (figura en anexo 7.5.3) mantuvieron sus gestaciones a pesar de tener perfiles de eCG tan deficientes como las de las tres yeguas que abortaron. Existen indicios de que en estos casos podría haber existido una sensibilidad excepcional a la eCG o haber ocurrido secreción de LH en cantidad suficiente para evitar la dependencia de la eCG. Así, la yegua “Cariño” (figura 7.19) mostró entre la semana 5 y la semana 7 una elevación en las concentraciones de progesterona similar a la registrada en las yeguas con gestación normal de eCG. Además, en la semana 9 formó un cuerpo lúteo accesorio a pesar de tener concentraciones bajísimas de eCG durante la semana previa. Por su parte, la yegua “Candela” (figura 7.21) mostró entre la semana 5 y la semana 11 elevaciones periódicas en sus concentraciones de progesterona que no estuvieron acompañadas por la formación de cuerpos lúteos accesorios ni por elevaciones de eCG, pero que lograron mantener el perfil general de progesterona cerca del perfil normal para yeguas servidas con burro. Adicionalmente, entre la semana 13 y 14 formó dos cuerpos lúteos accesorios a pesar de que las concentraciones de eCG se habían mantenido indetectables durante muchas semanas. La yegua “Rubia” (figura en anexo 7.5.3) también mantuvo concentraciones de progesterona similares al perfil normal de progesterona a pesar de que sus concentraciones de eCG bajaron en forma prematura. Esta yegua logró formar un cuerpo lúteo accesorio durante su muy breve periodo de secreción de eCG. Finalmente, la yegua “Gitana” (figura en anexo 7.5.3) también logró formar un cuerpo lúteo accesorio en la semana 5, lo que ayudo a mantener niveles de progesterona cercanos a los 5 ng/ml. Adicionalmente, esta yegua mostró a partir de la semana 9 un muy marcado incremento en las concentraciones de progesterona, que aunque no fue acompañado por el registro ultrasonográfico de la formación de un nuevo cuerpo lúteo accesorio sugiere por lo menos una luteinización

folicular que podría haberse dado en respuesta a los muy bajos niveles de eCG presentes aún durante la semana previa.

Boeta y Zarco (2005) también informaron de 7 casos de yeguas servidas con burro que llevaron a buen término sus gestaciones a pesar de nunca haber mostrado elevaciones de eCG. Desafortunadamente en ese trabajo no se realizó un seguimiento ultrasonográfico de los ovarios, por lo que no es posible saber si dichas yeguas fueron capaces de formar cuerpos lúteos accesorios en ausencia de eCG. En todo caso, los resultados del presente trabajo junto con los de Boeta y Zarco (2005) indican que aunque la deficiencia de eCG puede en algunos casos resultar en aborto, dicha hormona no es siempre indispensable para mantener la gestación y podrían existir otras formas de mantener una estimulación lútea suficiente, como ha sido sugerido por Allen (1984), Allen et al (2001b) y Boeta y Zarco (2005). Por otra parte, es posible que después de la semana 10 de la gestación la producción de progestágenos placentarios sea suficiente para mantener la gestación (Pashen and Allen, 1979; Strauss et al, 1996), como lo sugiere el caso de 5 yeguas servidas con caballo en las que las concentraciones de progesterona se redujeron drásticamente a partir de dicha semana (anexo 7.5.2) y sin embargo mantuvieron gestaciones normales. Es evidente que en estas yeguas la ausencia de eCG resultó en disfunción lútea, a pesar de lo cual la gestación se mantuvo. En una de las yeguas ("Martina") la gestación se mantuvo a pesar de que ultrasonográficamente se detectó la desaparición de sus dos cuerpos lúteos durante la semana 13 de su gestación.

La luteolisis activa parece haber sido la causa de dos abortos (figuras 7.11 y 7.12) y haber contribuido a uno más (figura 7.13). Tampoco puede descartarse que haya sido la causa de un aborto más (figura 7.9). La magnitud y velocidad de la caída en las concentraciones de progesterona que precedió a la muerte del producto es compatible con una regresión lútea por secreción activa de PGF2 α (Daels et al, 1989; 1991). Previamente Boeta y Zarco (2005) habían descrito 6 casos de aborto acompañados de una repentina destrucción de los cuerpos lúteos. Experimentalmente se ha demostrado que la administración exógena de endotoxinas

provoca secreción de PGF2 α y aborto en yeguas gestantes (Daels et al, 1991). También se ha demostrado que la presencia de eCG durante la gestación de la yegua protege a los cuerpos lúteos de la gestación contra los efectos luteolíticos de la PGF2 α , por lo que Boeta y Zarco (2005) propusieron que la pobre producción de eCG en yeguas servidas con burro podría predisponerlas a sufrir regresión lútea ante cualquier factor exógeno capaz de inducir la secreción de PGF2 α , como sería una endotoxemia por cólico, laminitis, trauma, etc. A este respecto, en estudios preliminares hemos encontrado que las yeguas servidas con burro son mucho más susceptibles a la administración exógena de PGF2 α , abortando con mayor frecuencia después de dicha administración (Flores et al, datos no publicados; Velázquez et al, datos no publicados), lo que apoya la idea de que una de las causas de mayor incidencia de abortos en yeguas servidas con burro es su mayor susceptibilidad a la secreción de PGF2 α , que a su vez es debida a su menor producción de eCG.

Con respecto a la secreción de sulfato de estrona, en el presente trabajo se encontró que algunos casos de hipofunción lútea prolongada estuvieron asociados con una deficiente secreción de sulfato de estrona durante varias semanas antes de producirse el aborto (figuras 7.8 y 7.15), lo que podría indicar que la deficiencia de progesterona afectó el desarrollo y/o función de la unidad feto-placentaria, ya que Terqui y Palmer (1979) demostraron que la producción de sulfato de estrona en la yegua gestante es dependiente tanto de la presencia de un feto viable que produzca cantidades normales de DHEA, como de la presencia de una placenta funcional con capacidad de aromatización normal, por lo que si alguna de las dos partes no esta funcionando adecuadamente la estrona puede dejar de producirse en cantidades adecuadas. Por otra parte, en todas las yeguas se produjo una abrupta caída en las concentraciones de sulfato de estrona inmediatamente antes o al mismo tiempo que se registró la muerte del producto, tal como lo describieron Henderson et al (1998) en abortos inducidos. Esto podría sugerir que el seguimiento de las concentraciones de esta hormona puede ser útil para monitorear la gestación cuando no se cuenta con ultrasonido. La determinación de sulfato de estrona en plasma y orina ha sido utilizada tanto para diagnosticar la gestación en yeguas después de los 70 días de

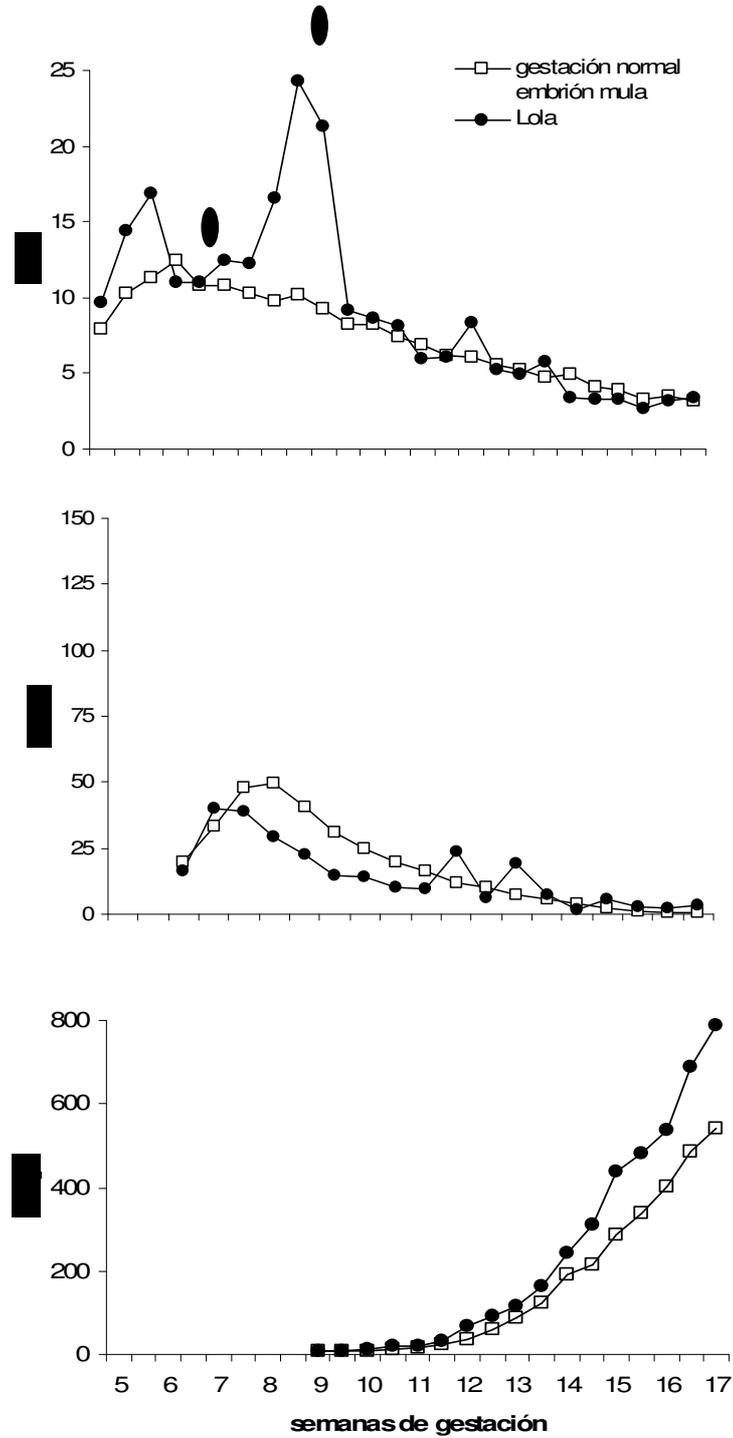
gestación como para monitorear la viabilidad fetal (Terqui y Palmer, 1979; Madej y Kindahl, 1987). Hasta donde sabemos, en el presente trabajo se demuestra por primera vez que los patrones de secreción de sulfato de estrona son similares en yeguas gestantes con embrión caballo y yeguas gestantes con embrión mula, por lo que los patrones de esta hormona pueden ser utilizados para monitorear gestaciones de yeguas servidas con burro en forma similar a como se hace en yeguas servidas con caballo.

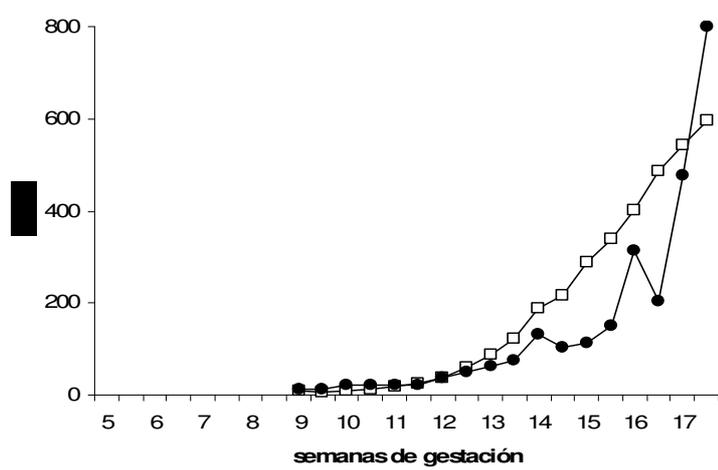
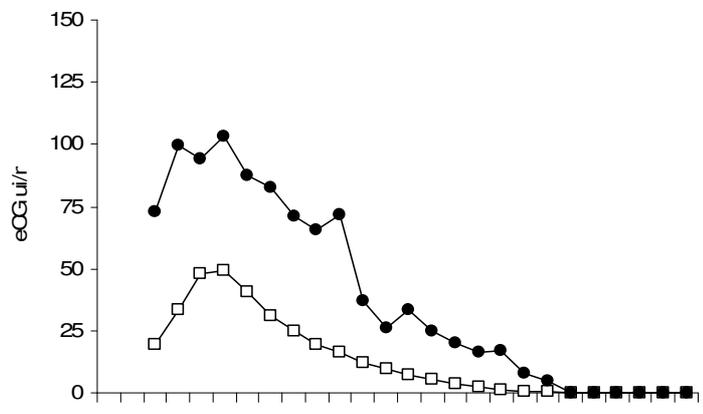
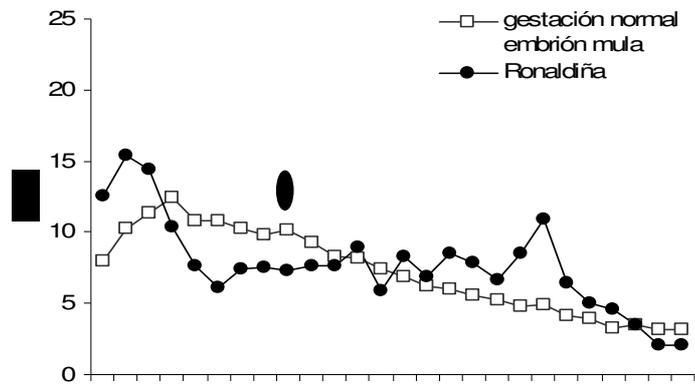
7.4 CONCLUSIONES

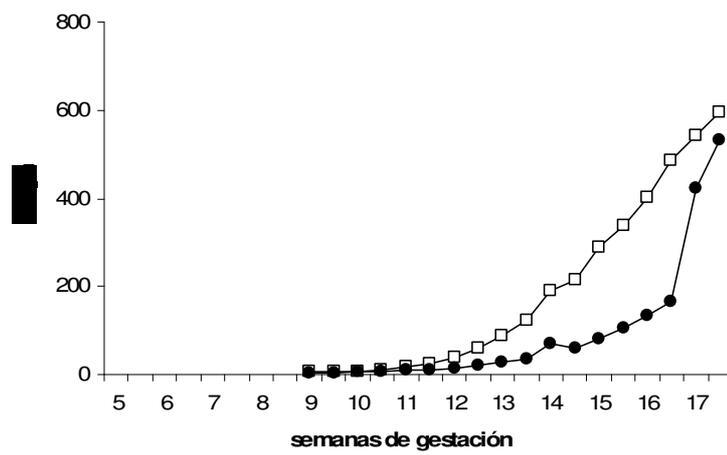
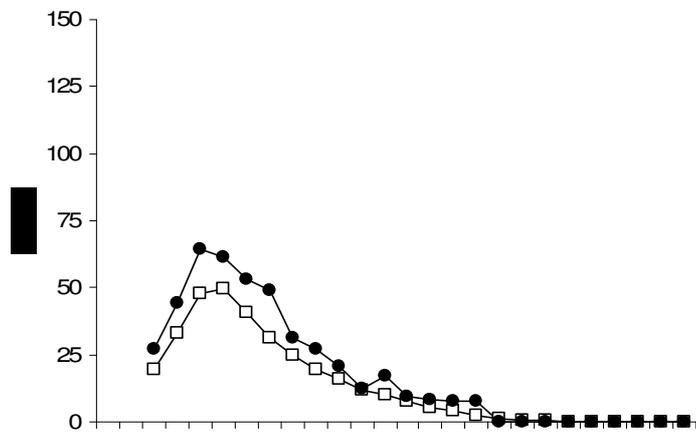
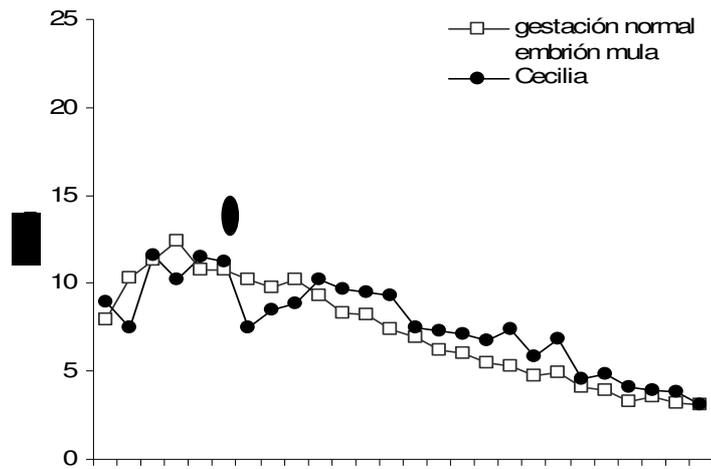
En este trabajo se concluye que las pérdidas de gestación ocurridas al final de la época ovulatoria no fueron significativamente mayores a las que se presentaron al inicio de la época ovulatoria, por lo que al tomar en cuenta una sola época se encontró que los abortos presentados en el grupo de yeguas servidas con burro fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) que los que se presentaron en yeguas servidas con caballo. Se confirmó que las concentraciones de progesterona y eCG circulantes en yeguas servidas con burro son significativamente menores que en las yeguas servidas con caballo, lo que aumenta el riesgo de sufrir aborto tanto por una insuficiencia lútea crónica como por un mayor riesgo de sufrir luteolisis activa. Sin embargo, también se demostró que la presencia de concentraciones elevadas de eCG no siempre es indispensable ni para la formación de cuerpos lúteos accesorios ni para mantener concentraciones de progesterona compatibles con una gestación exitosa.

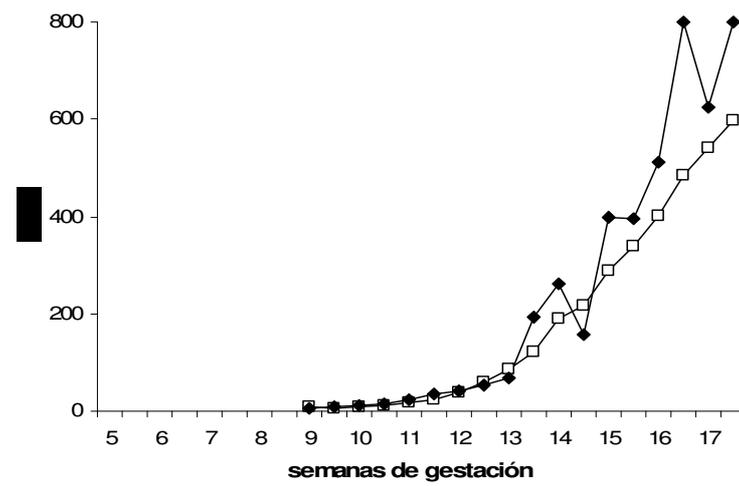
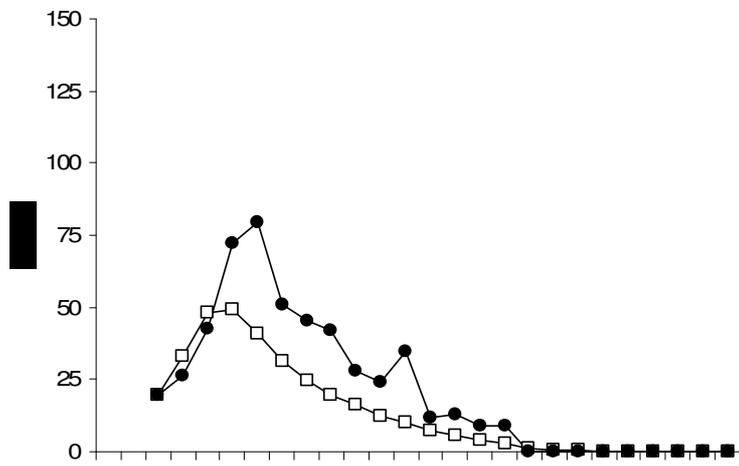
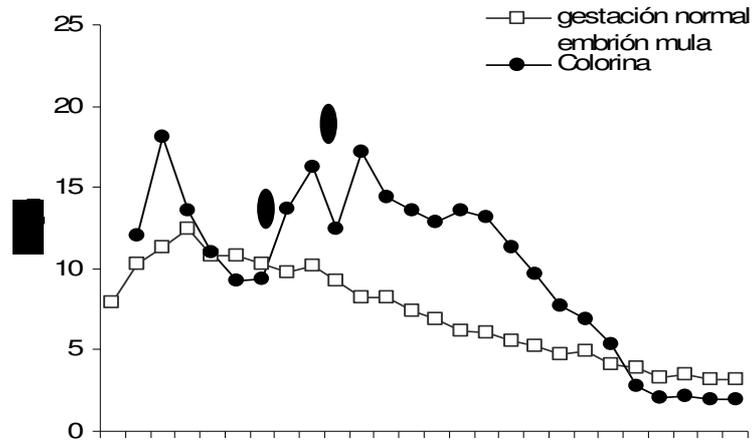
7.5 ANEXO – PERFILES HORMONALES DE LAS YEGUAS NO INCLUIDAS EN EL CUERPO DEL CAPÍTULO VII

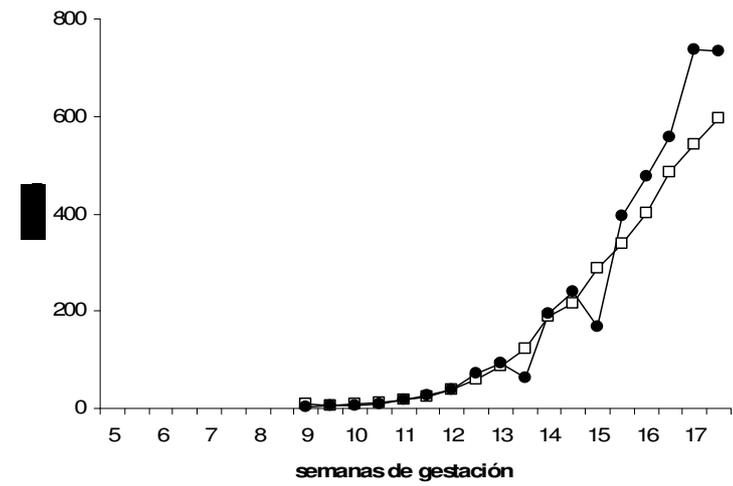
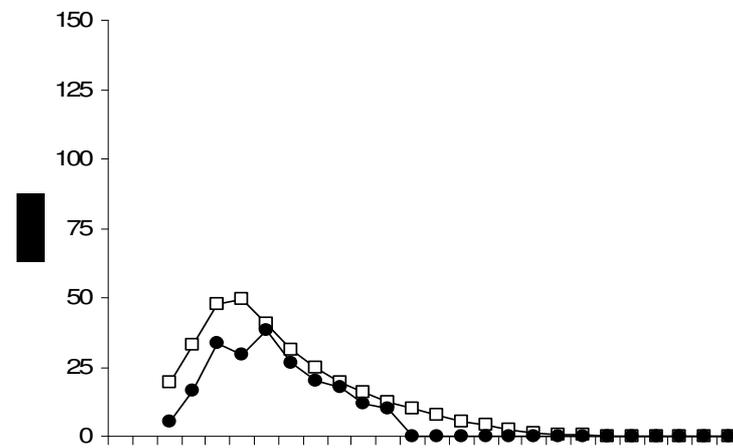
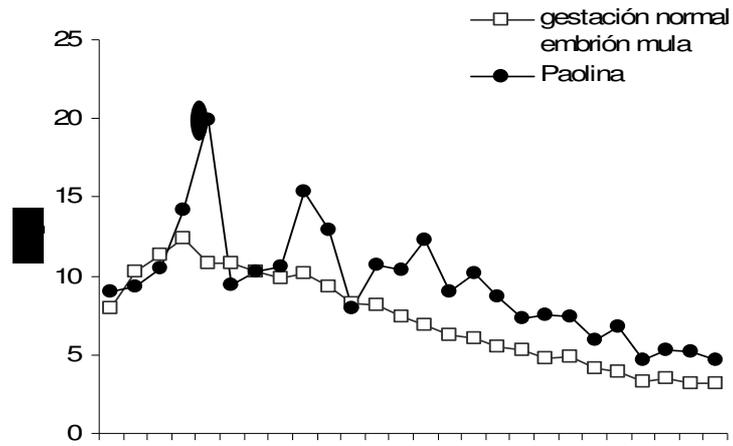
7.5.1 Yeguas servidas con burro que tuvieron gestación normal y concentraciones normales o elevadas de progesterona y eCG.

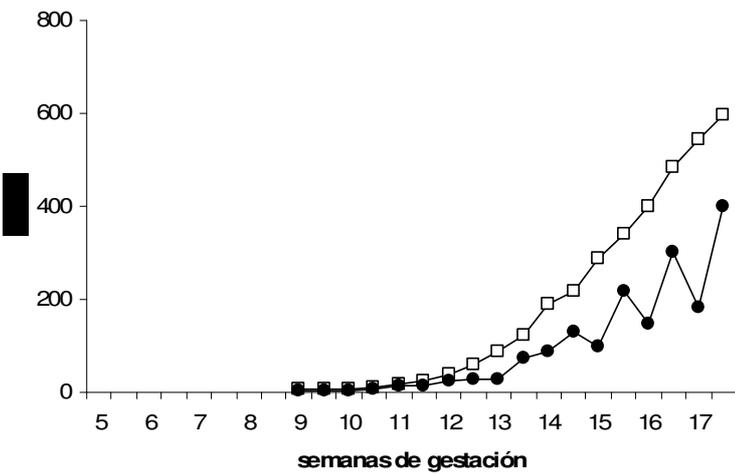
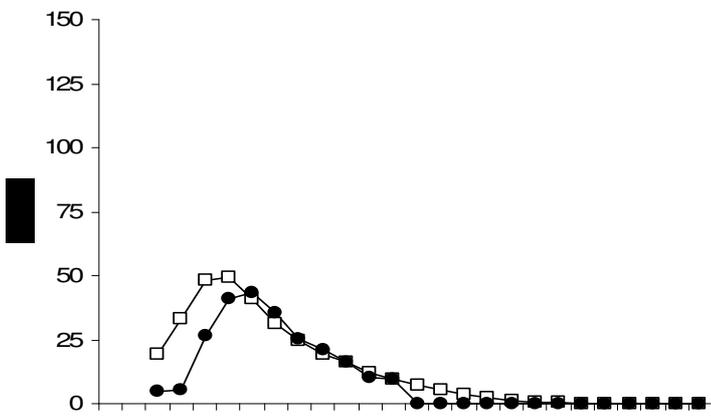
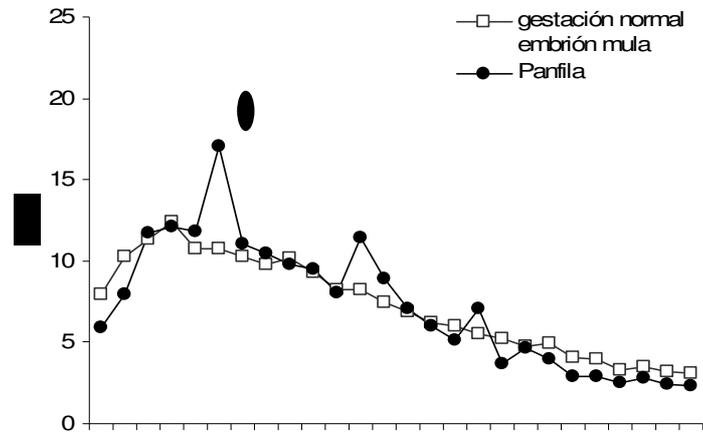


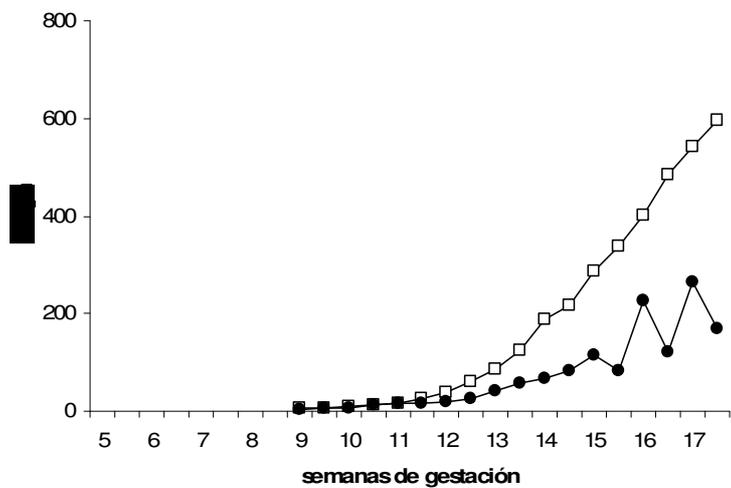
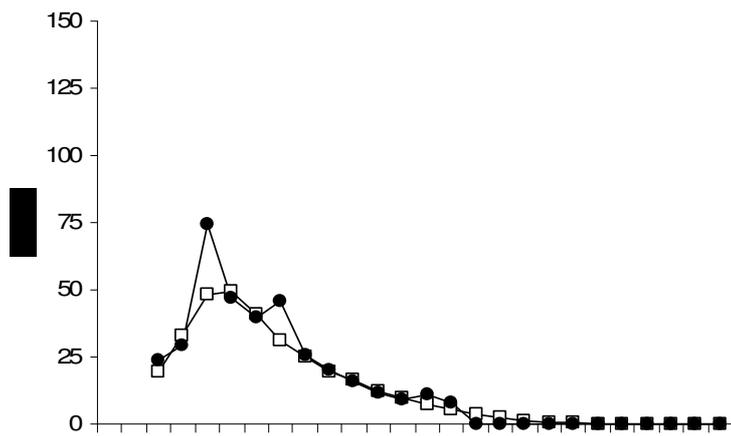
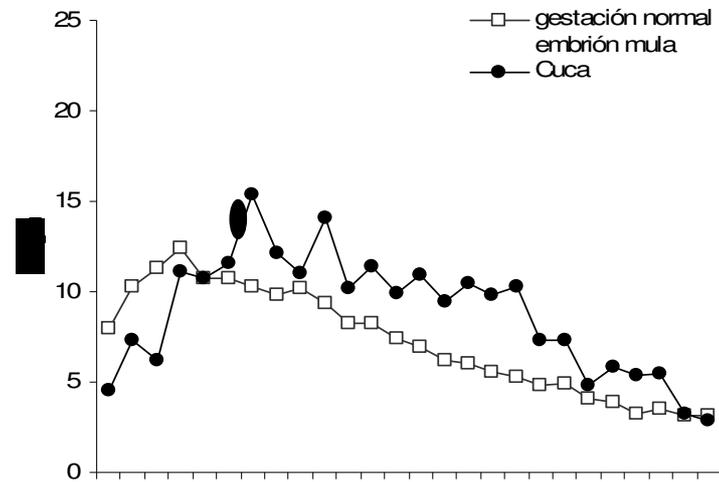


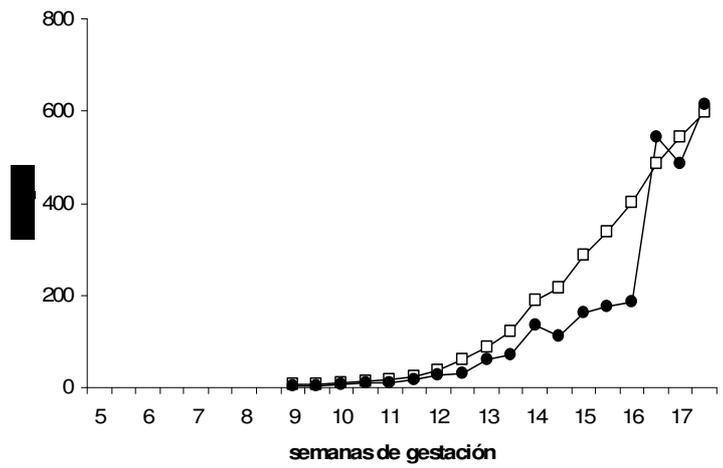
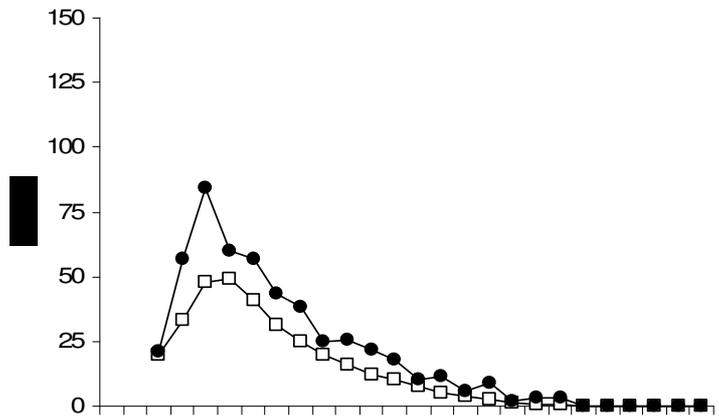
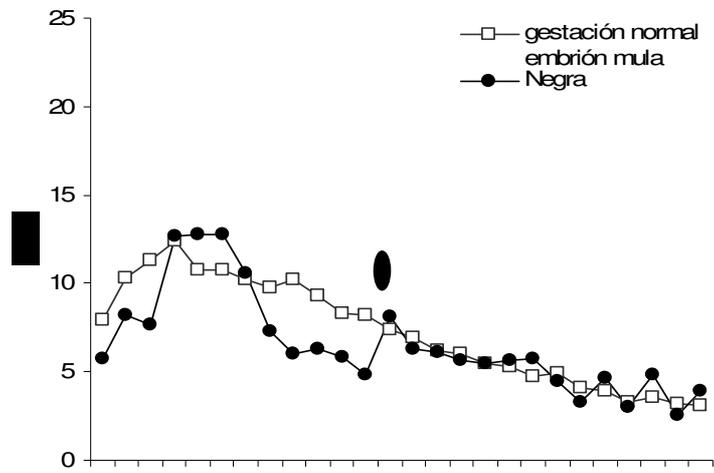


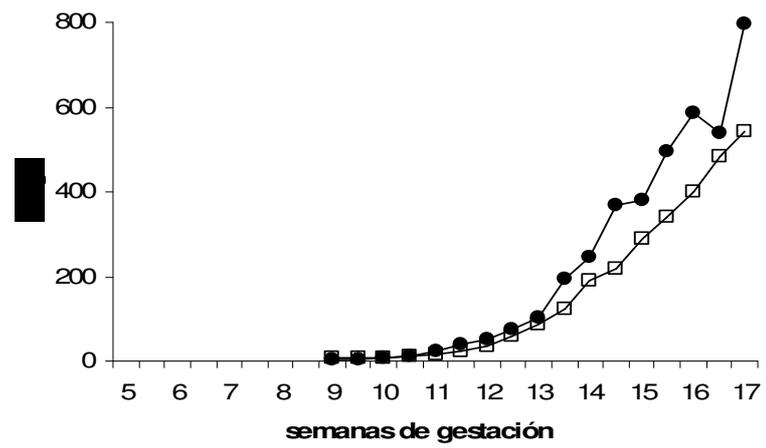
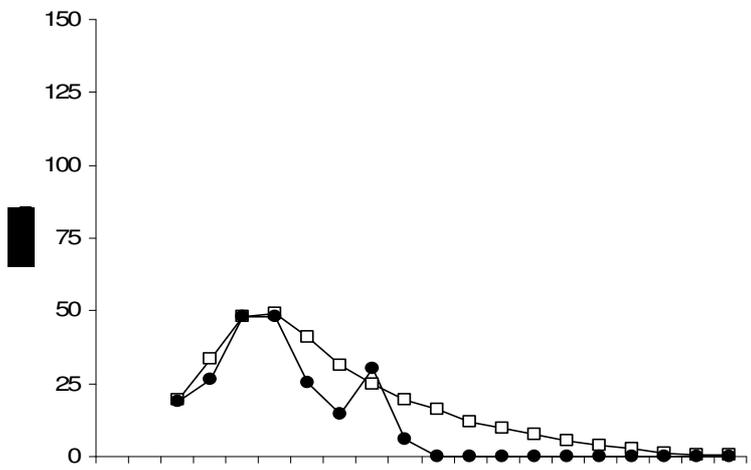
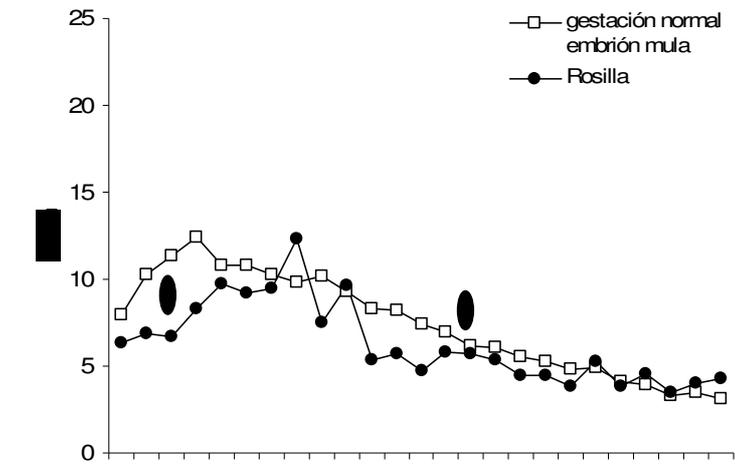


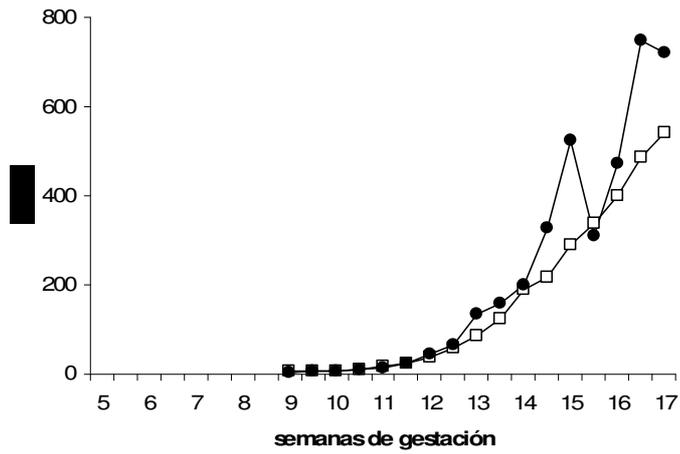
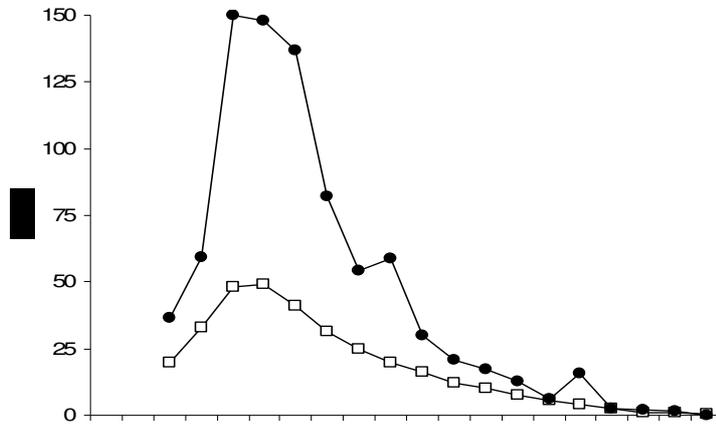
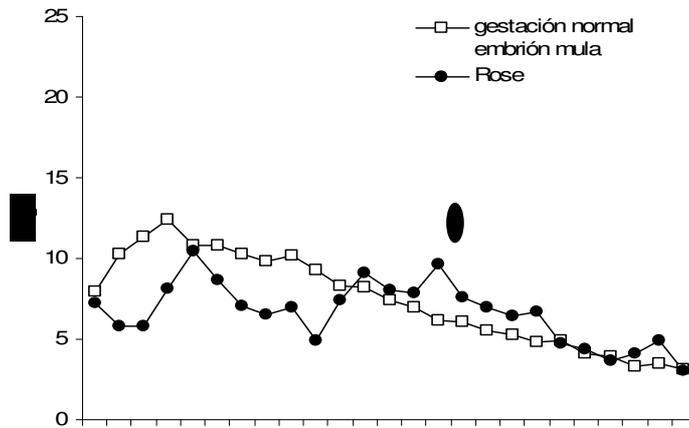




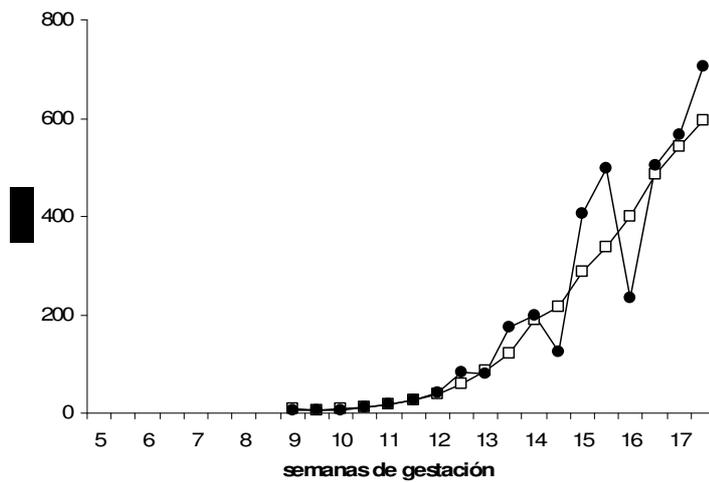
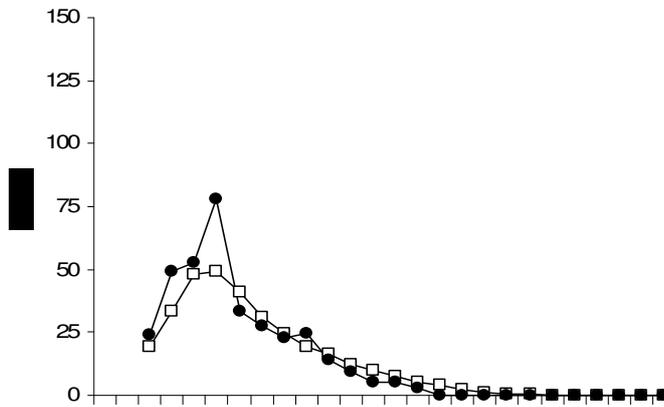
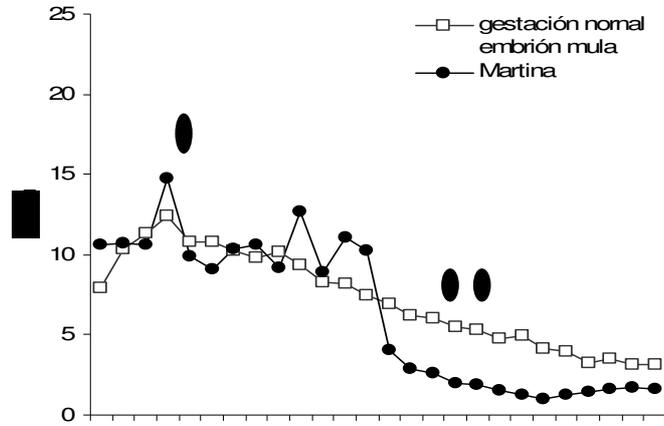




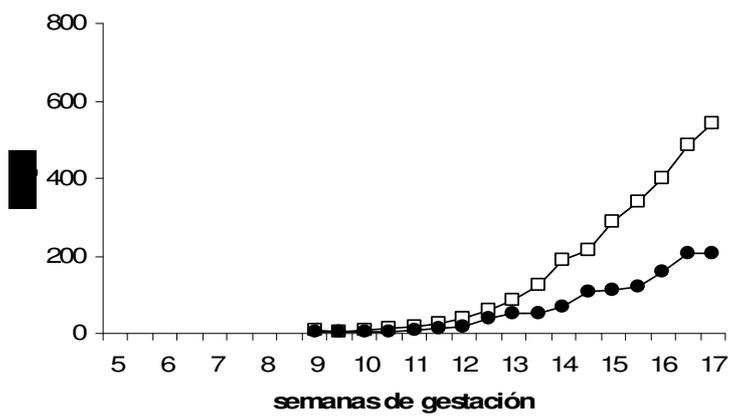
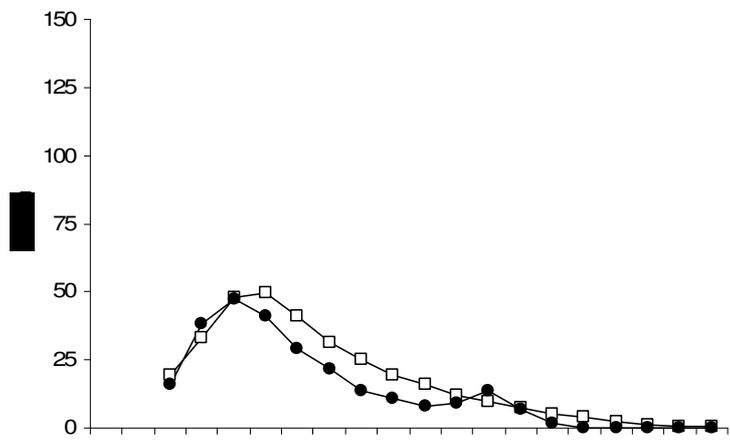
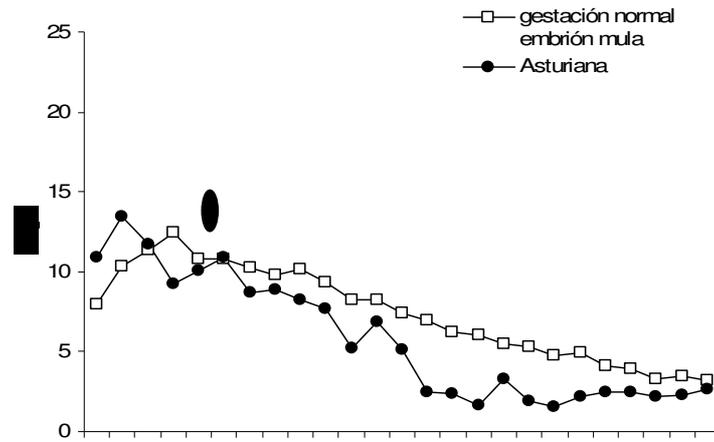


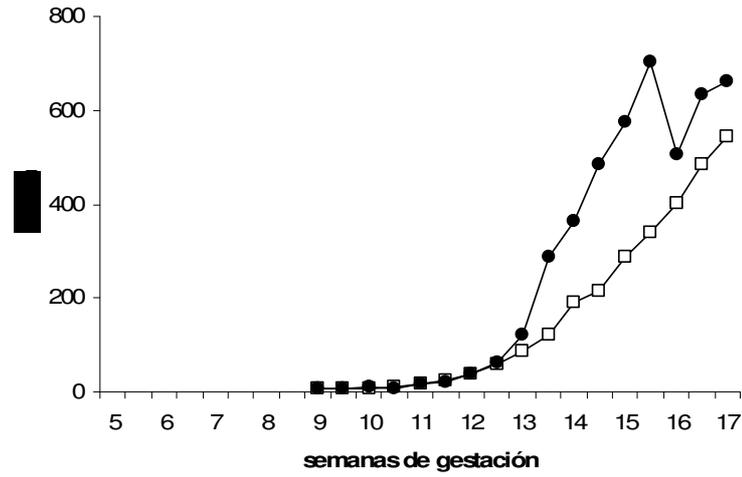
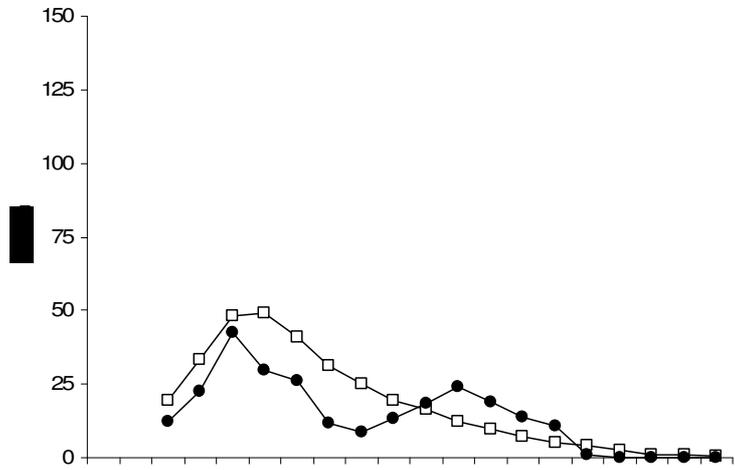
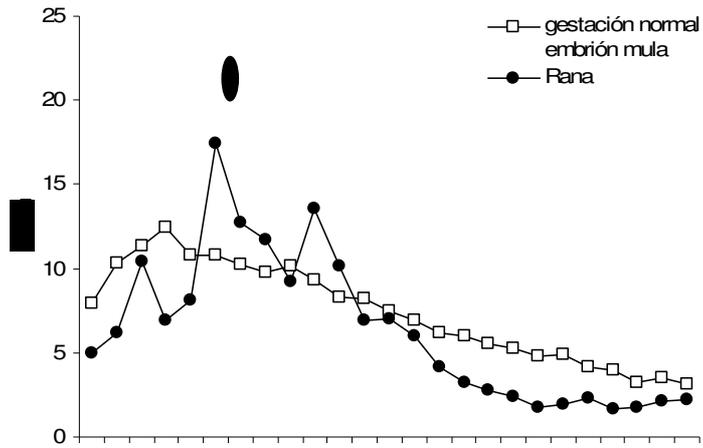


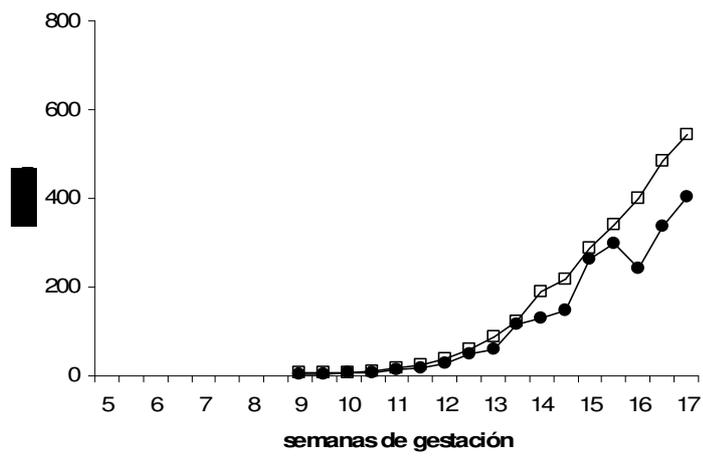
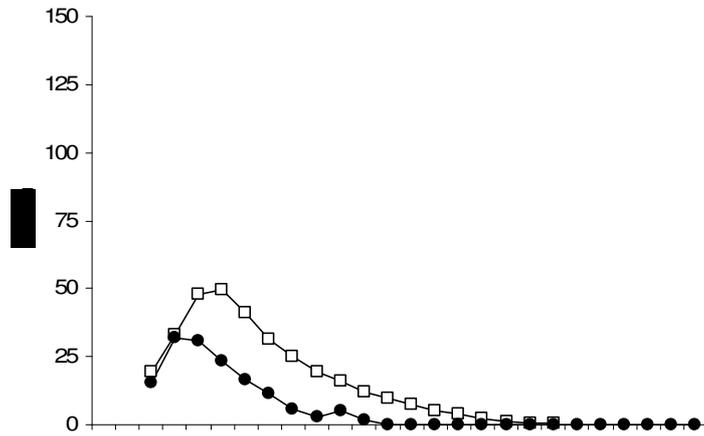
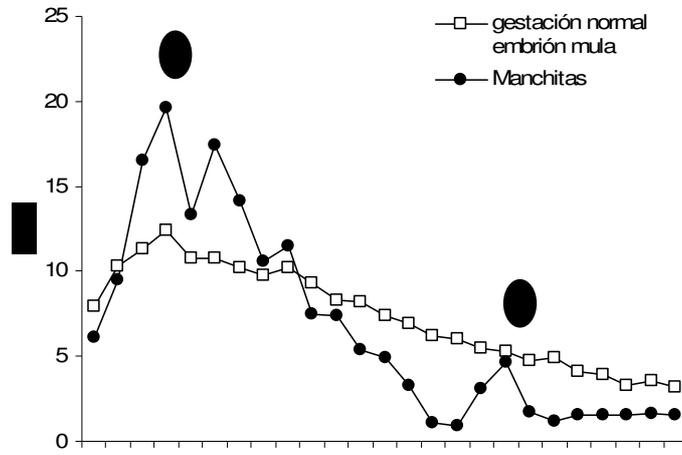
7.5.2 Yeguas servidas con burro que tuvieron gestación normal y concentraciones bajas de progesterona a partir de la semana 10.

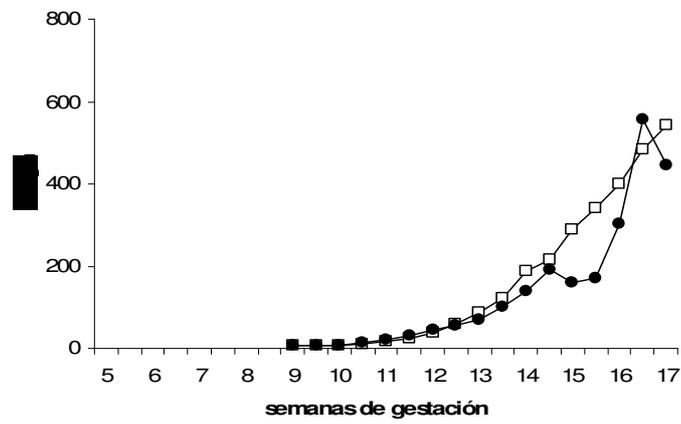
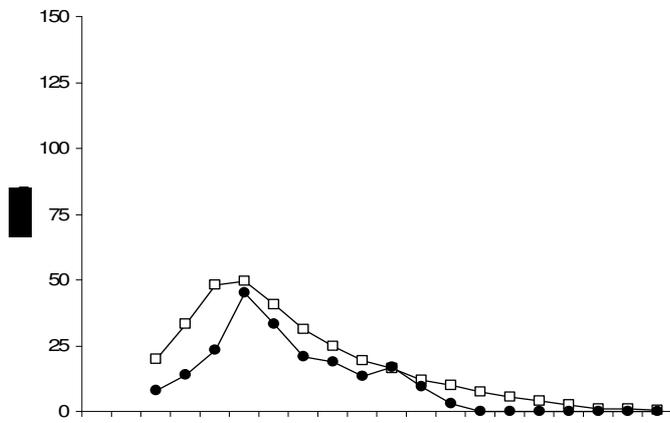
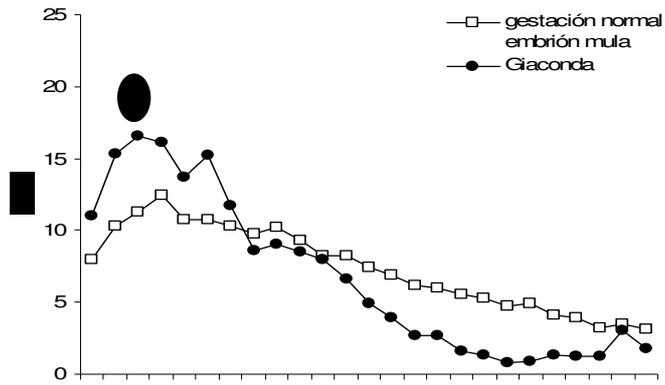


NOTA: EL óvalo negro denota la aparición de un cuerpo lúteo secundario. Los óvalos blancos denotan el momento en que el cuerpo lúteo primario y el secundario dejaron de observarse ultrasonográficamente

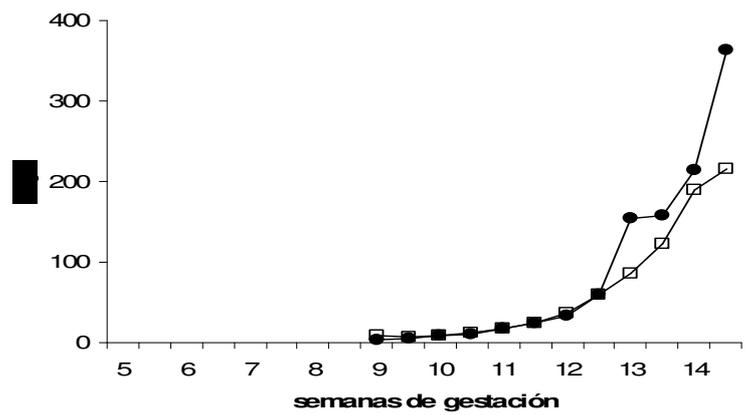
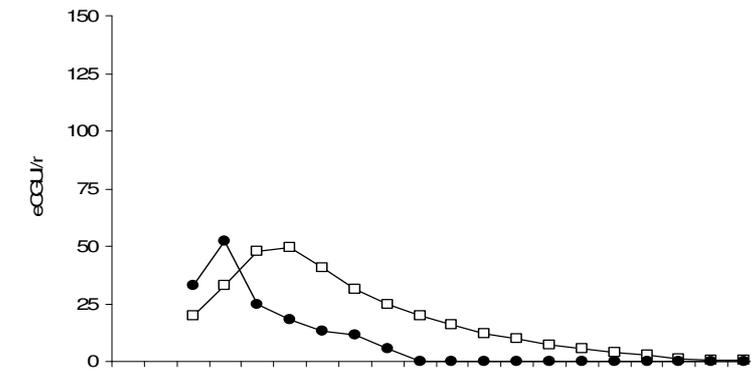
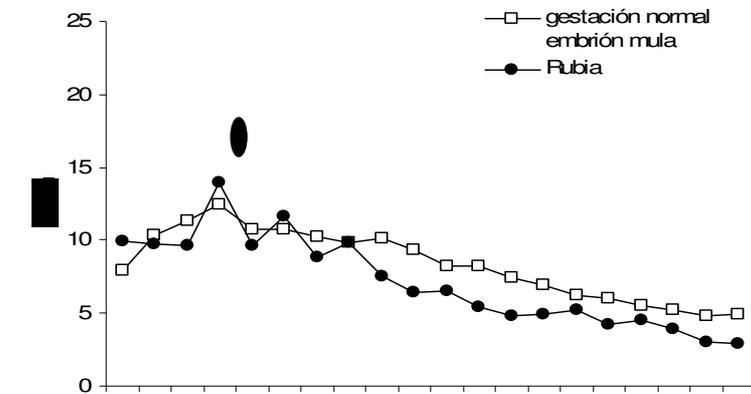


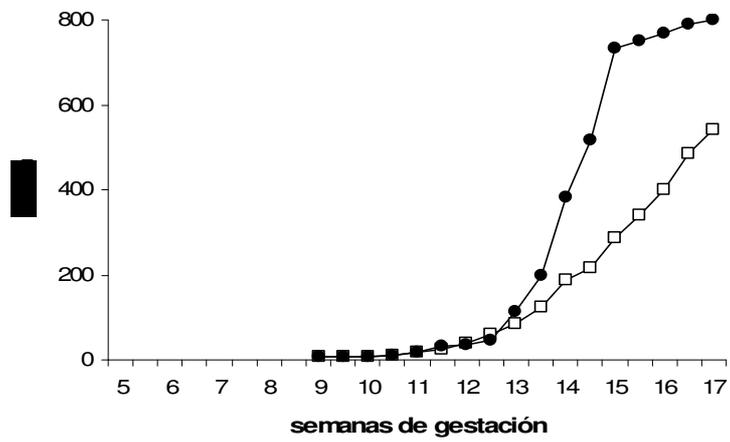
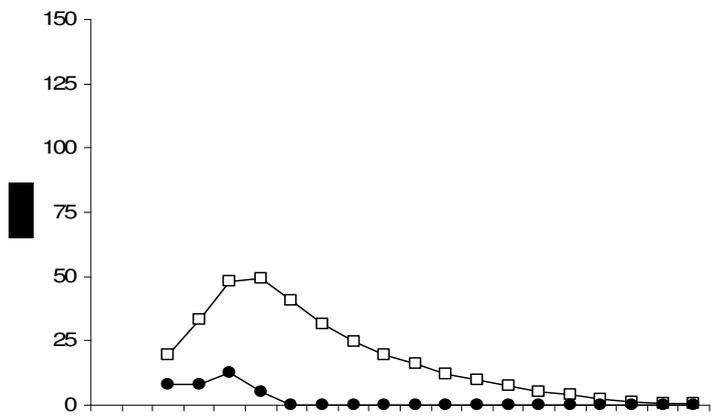
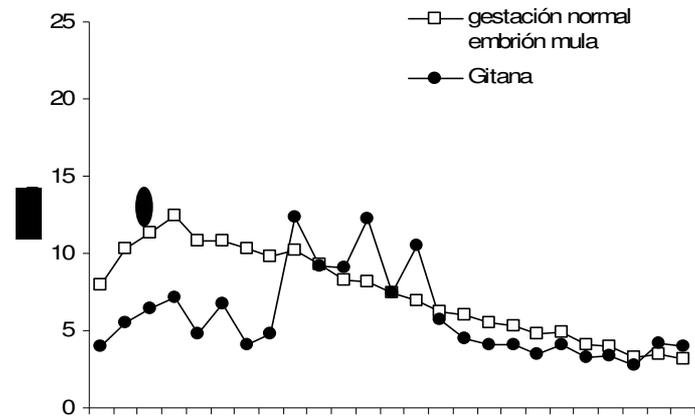




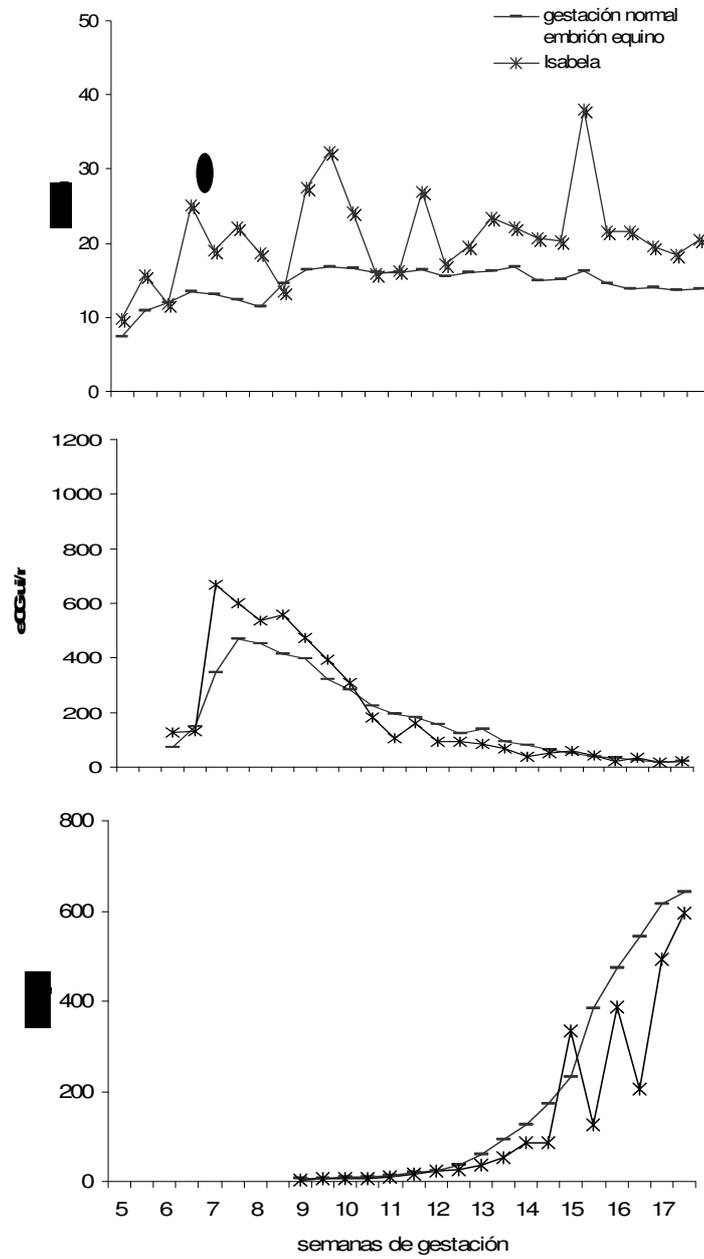


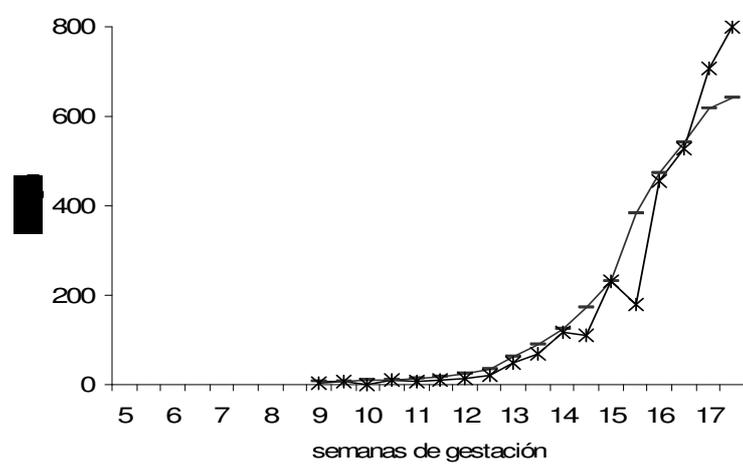
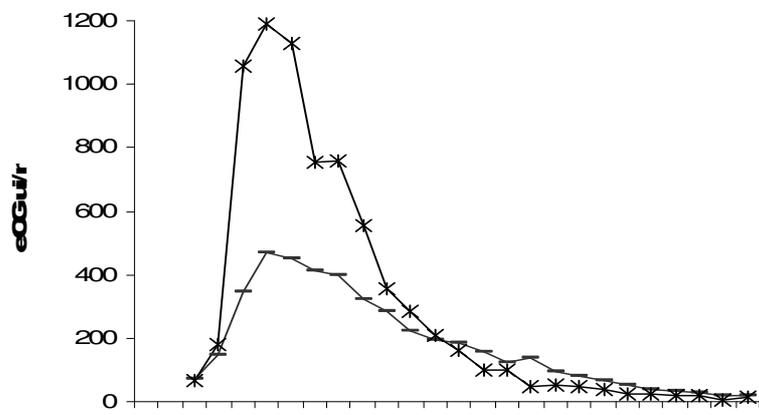
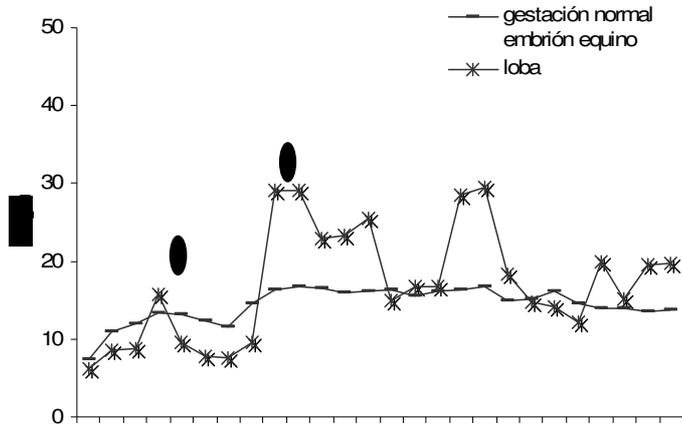
7.5.3 Yeguas servidas con burro que tuvieron gestación normal con concentraciones excesivamente bajas de eCG

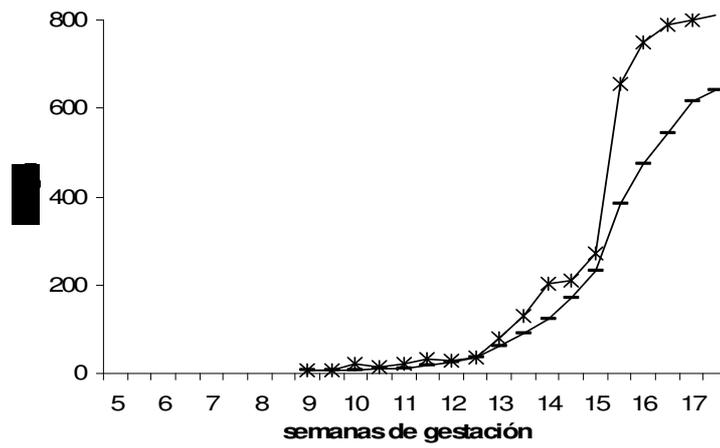
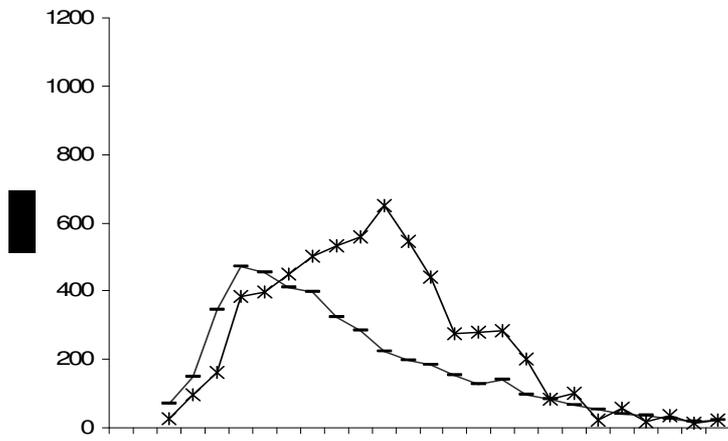
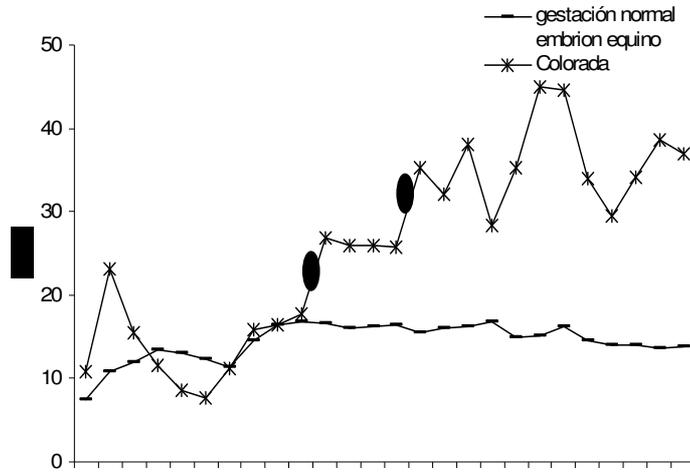


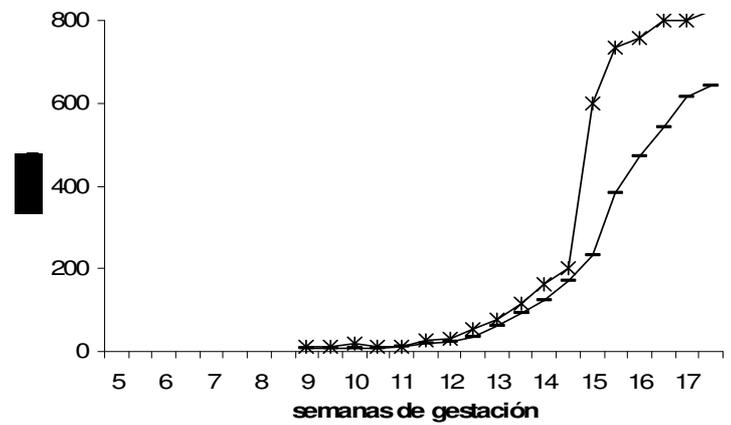
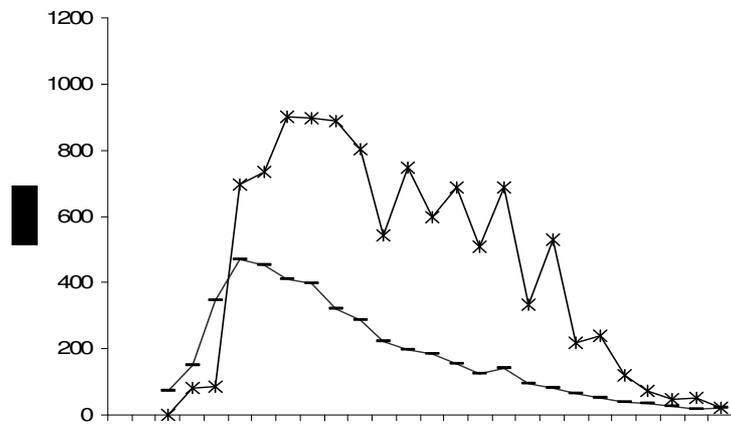
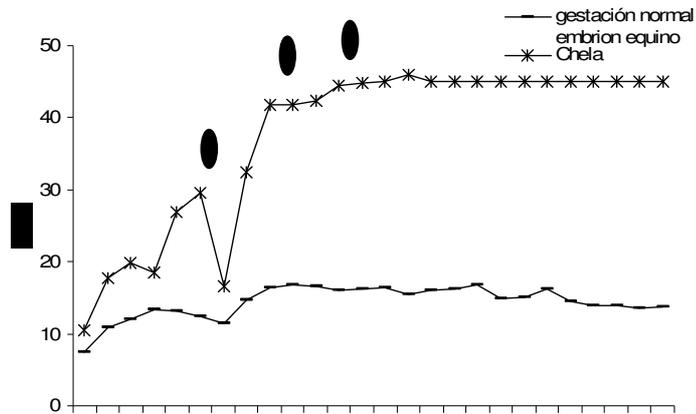


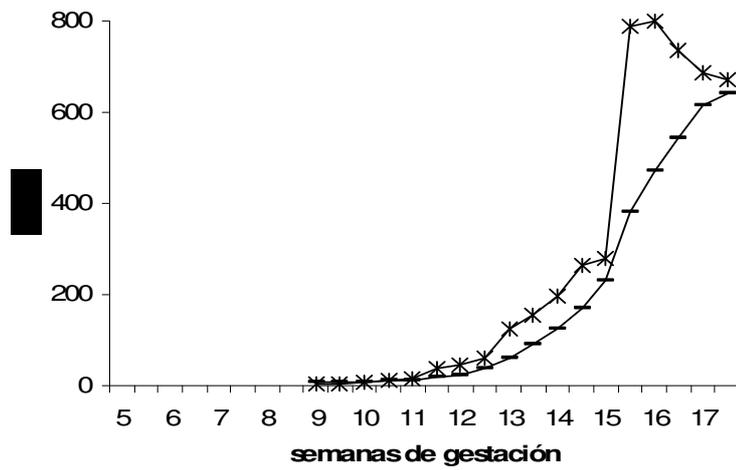
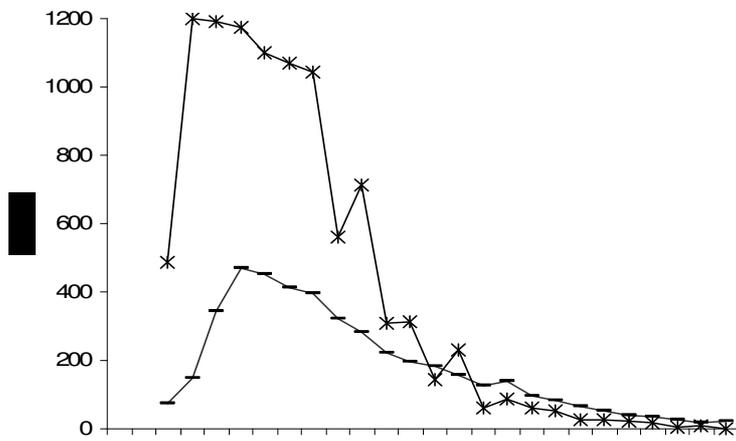
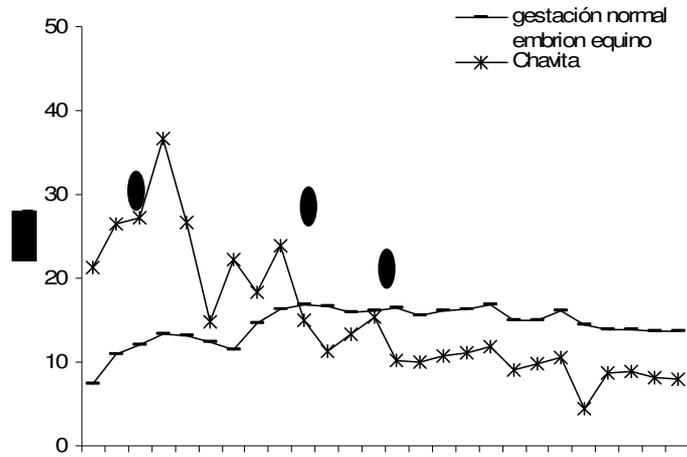
7.5.4 Yeguas servidas con caballo que tuvieron gestación normal

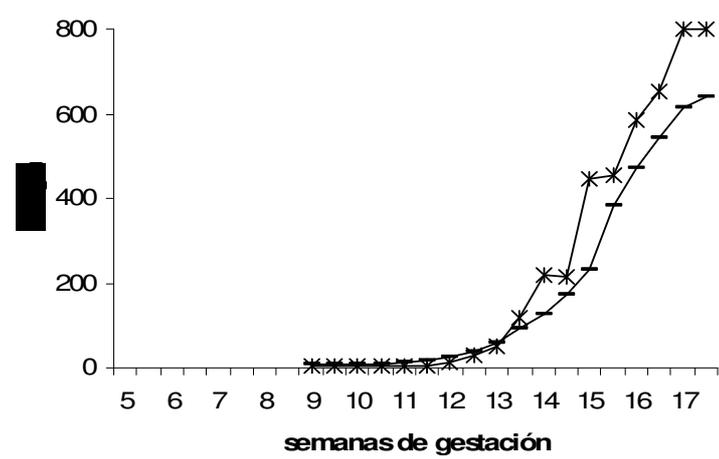
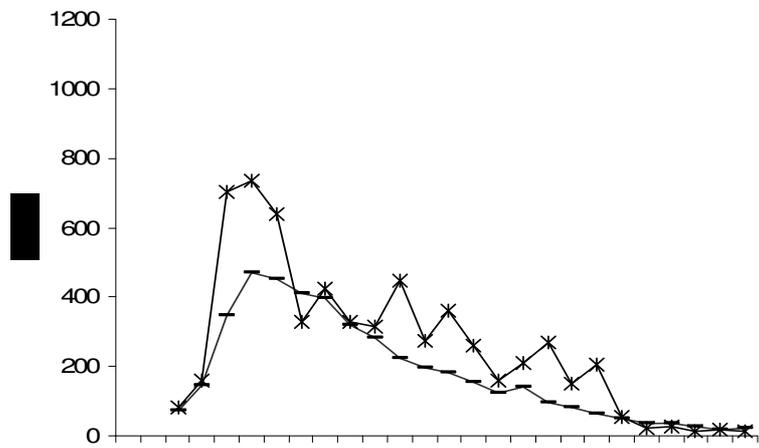
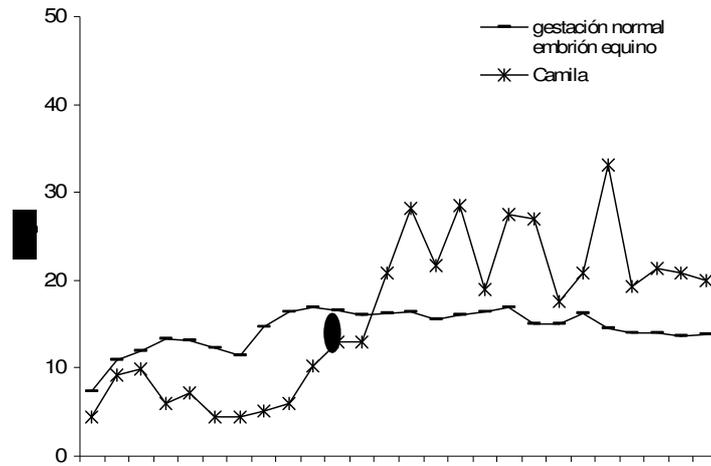


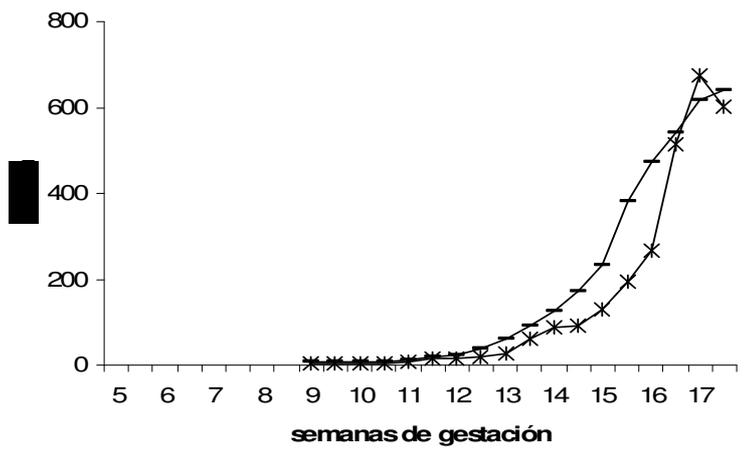
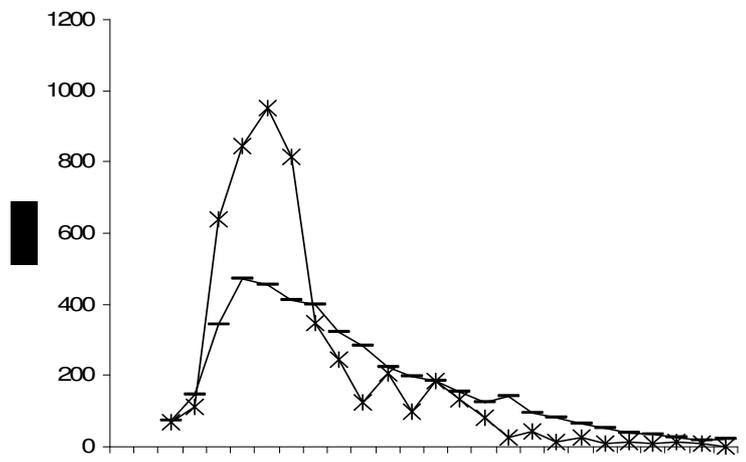
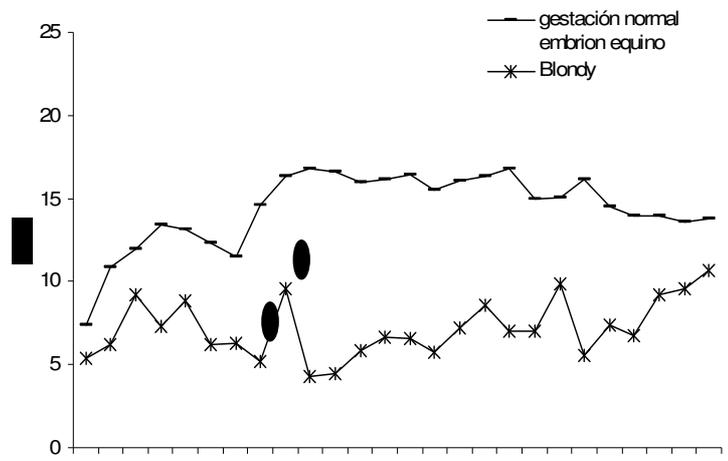


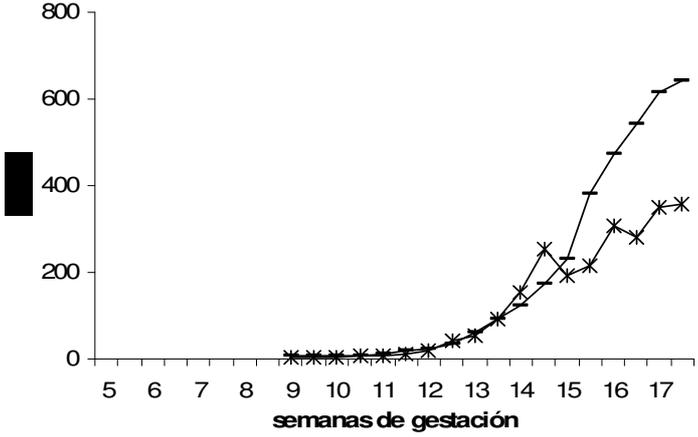
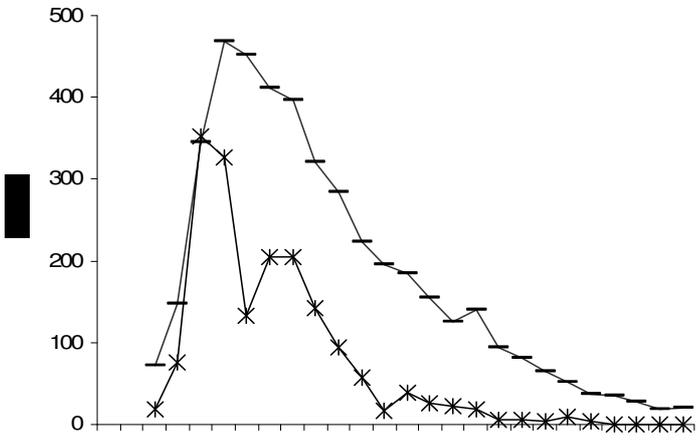
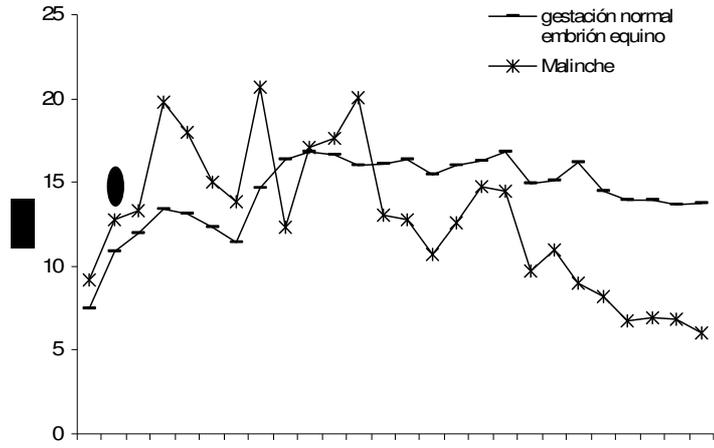


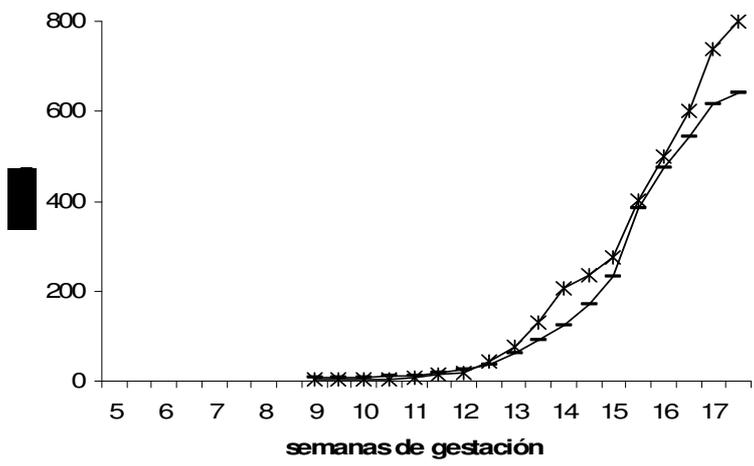
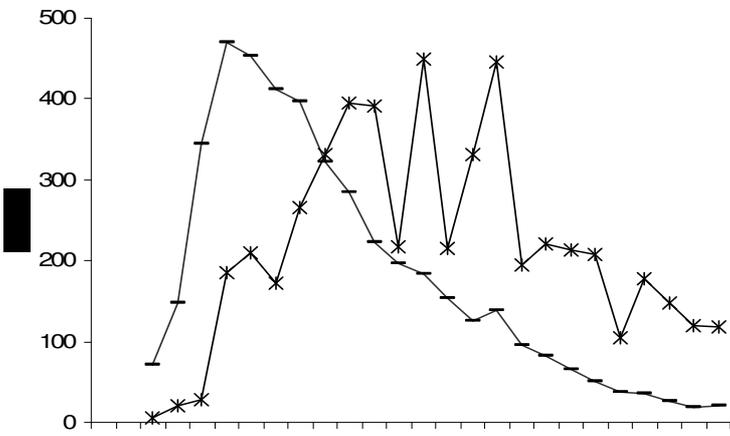
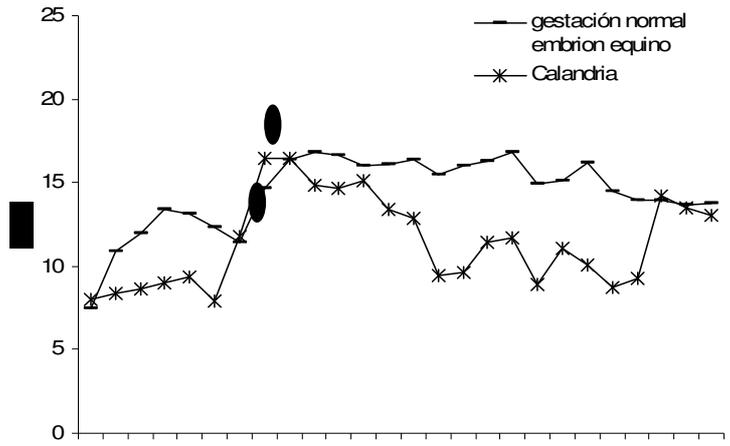


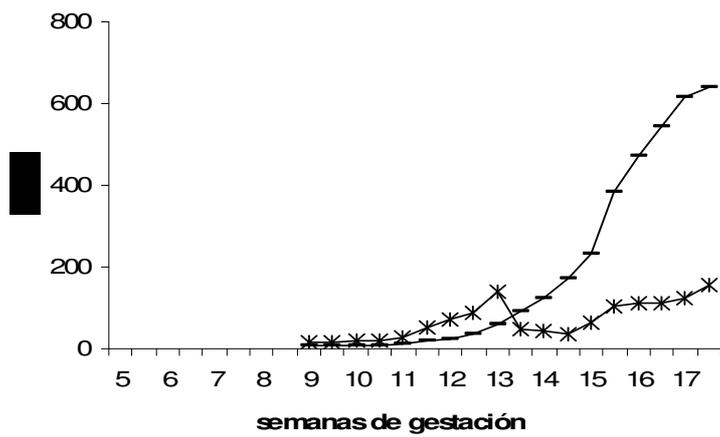
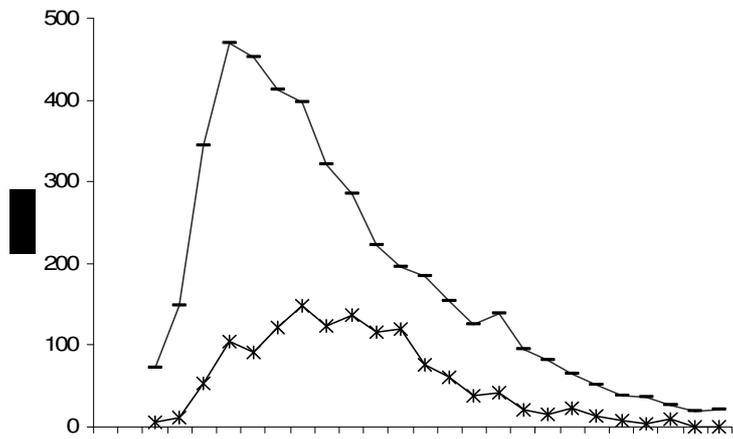
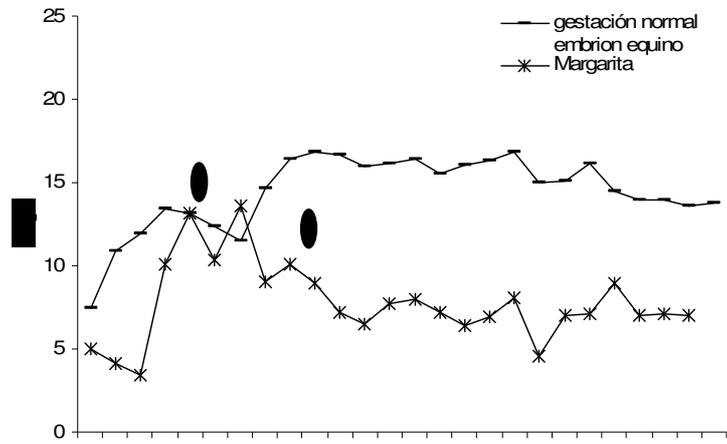


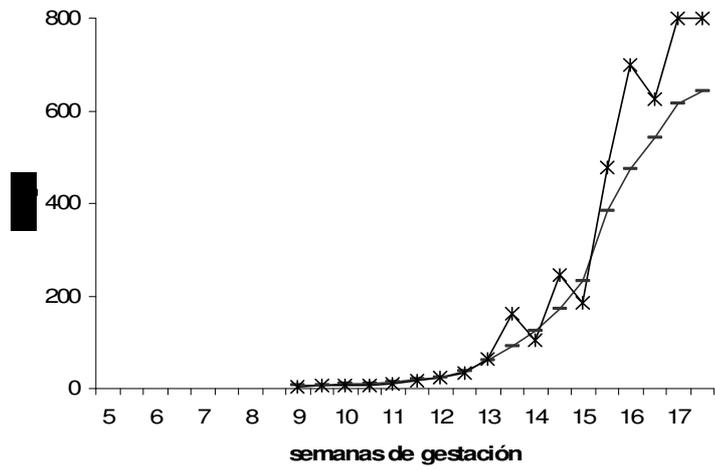
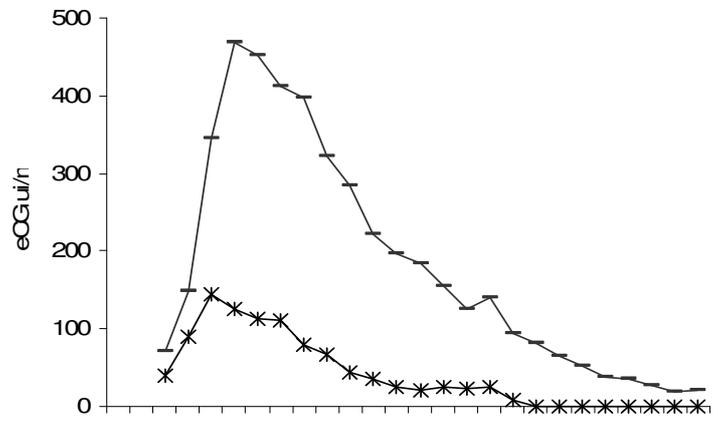
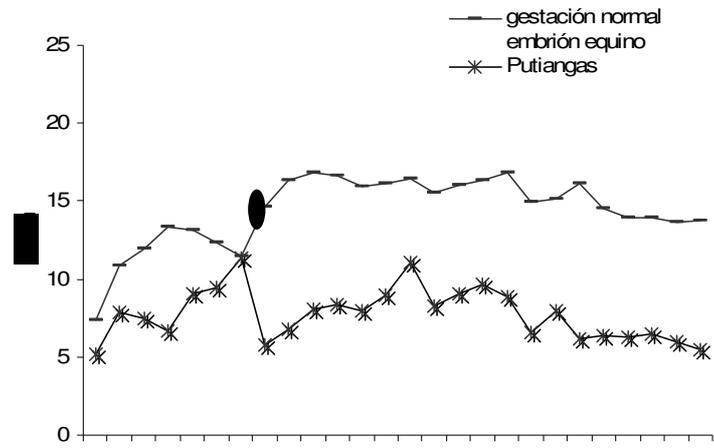


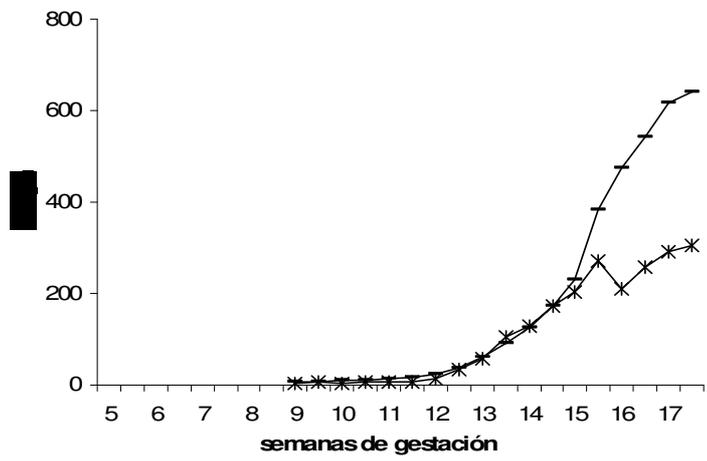
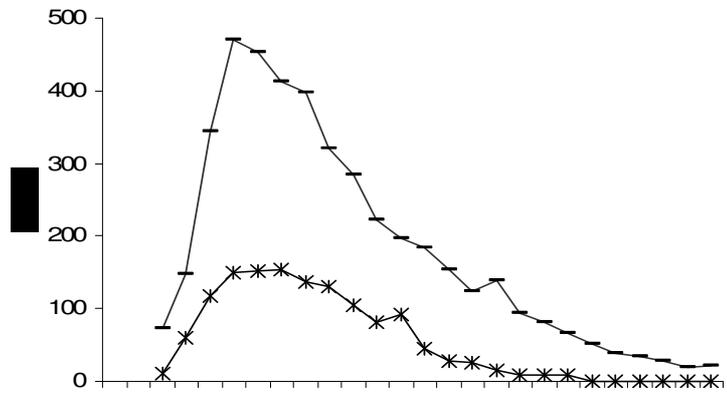
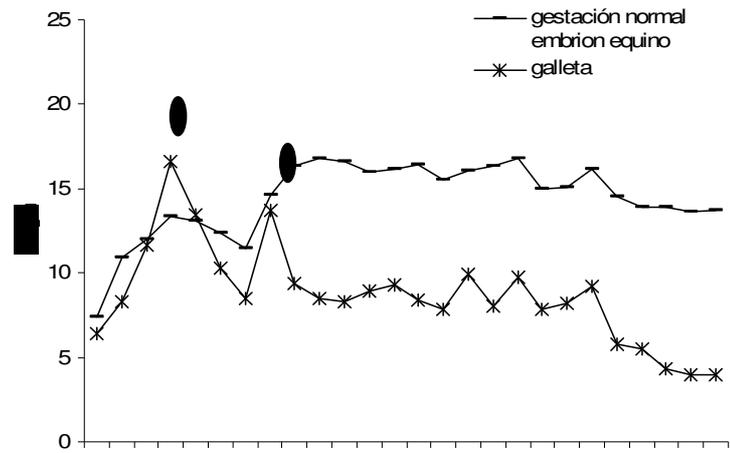


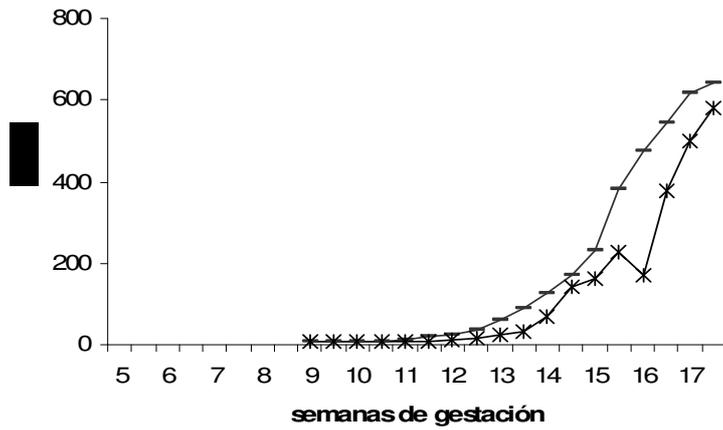
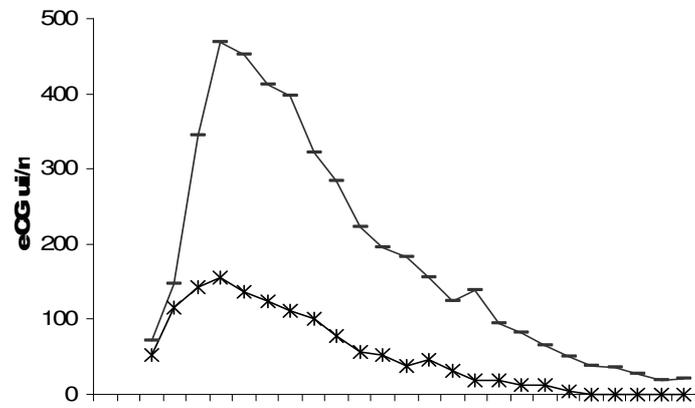
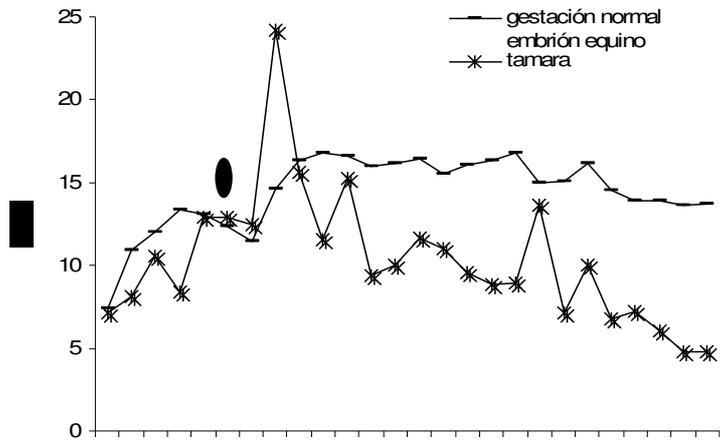


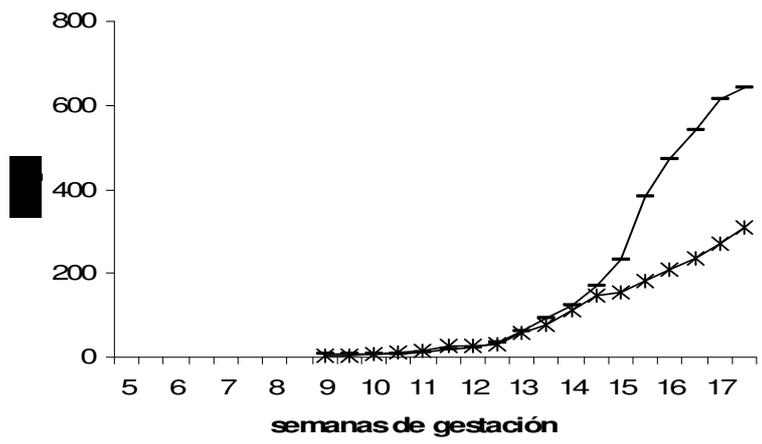
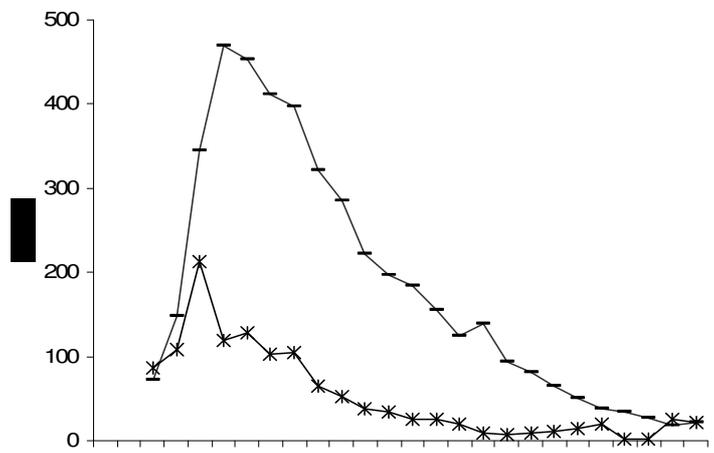
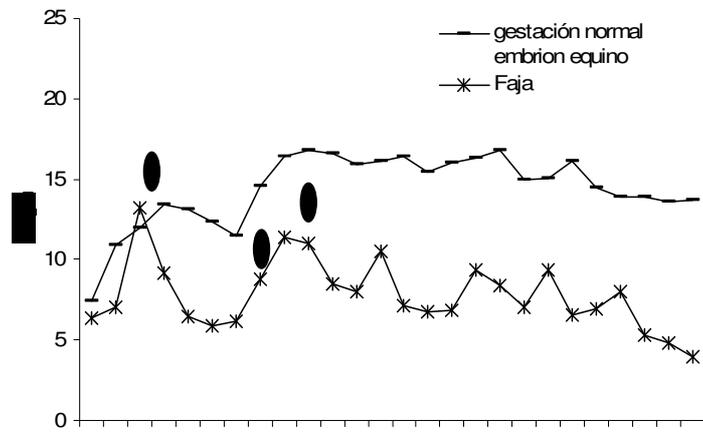


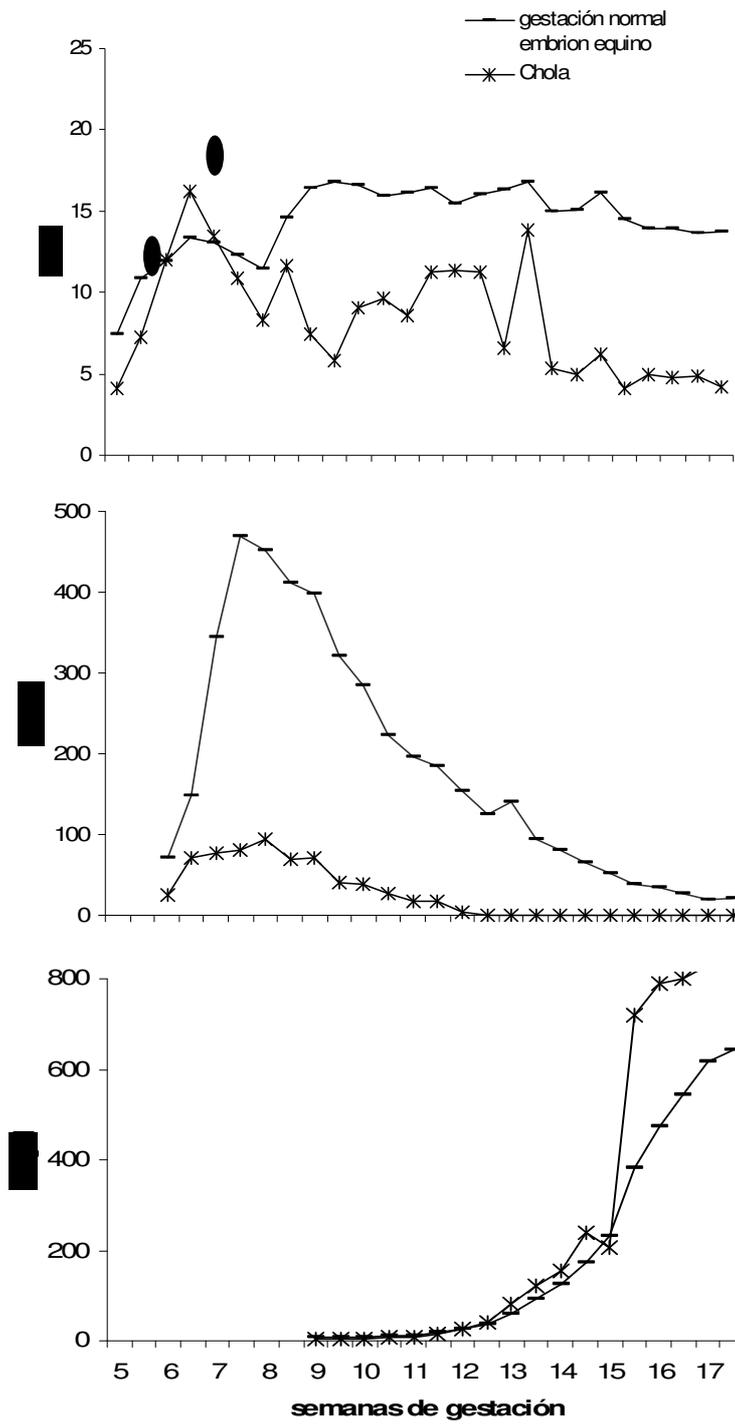


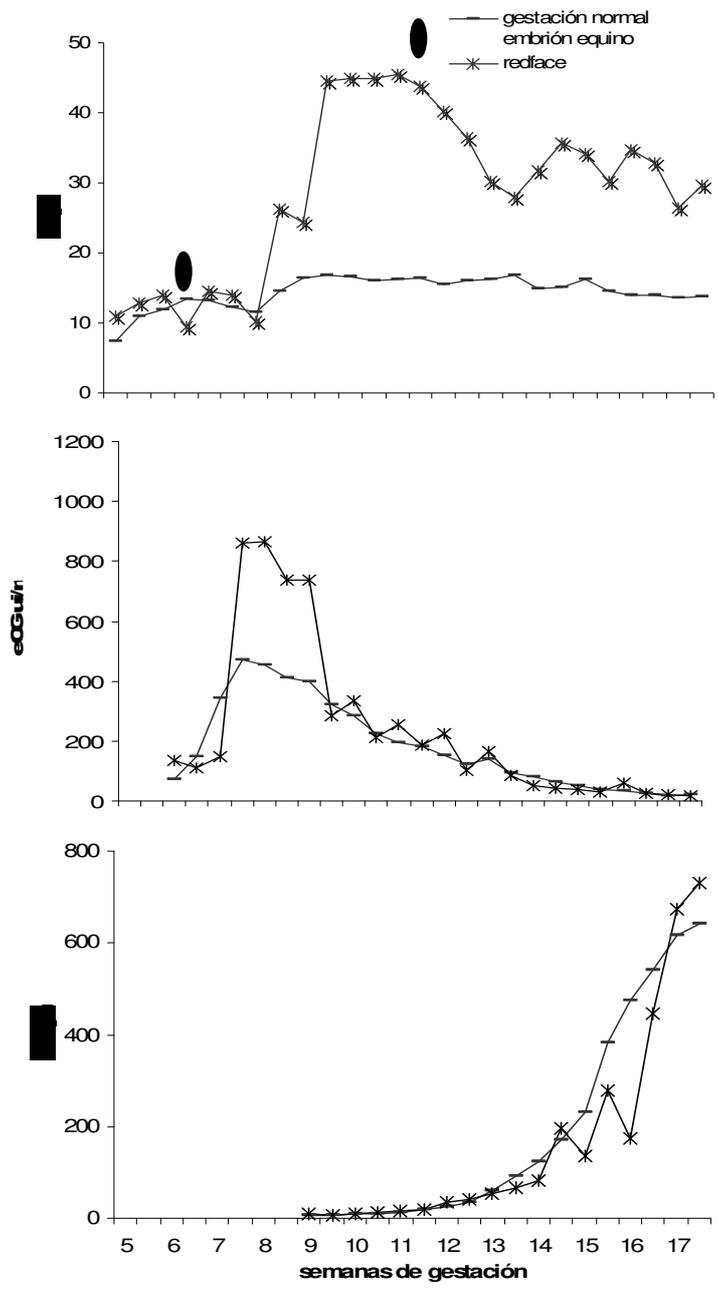


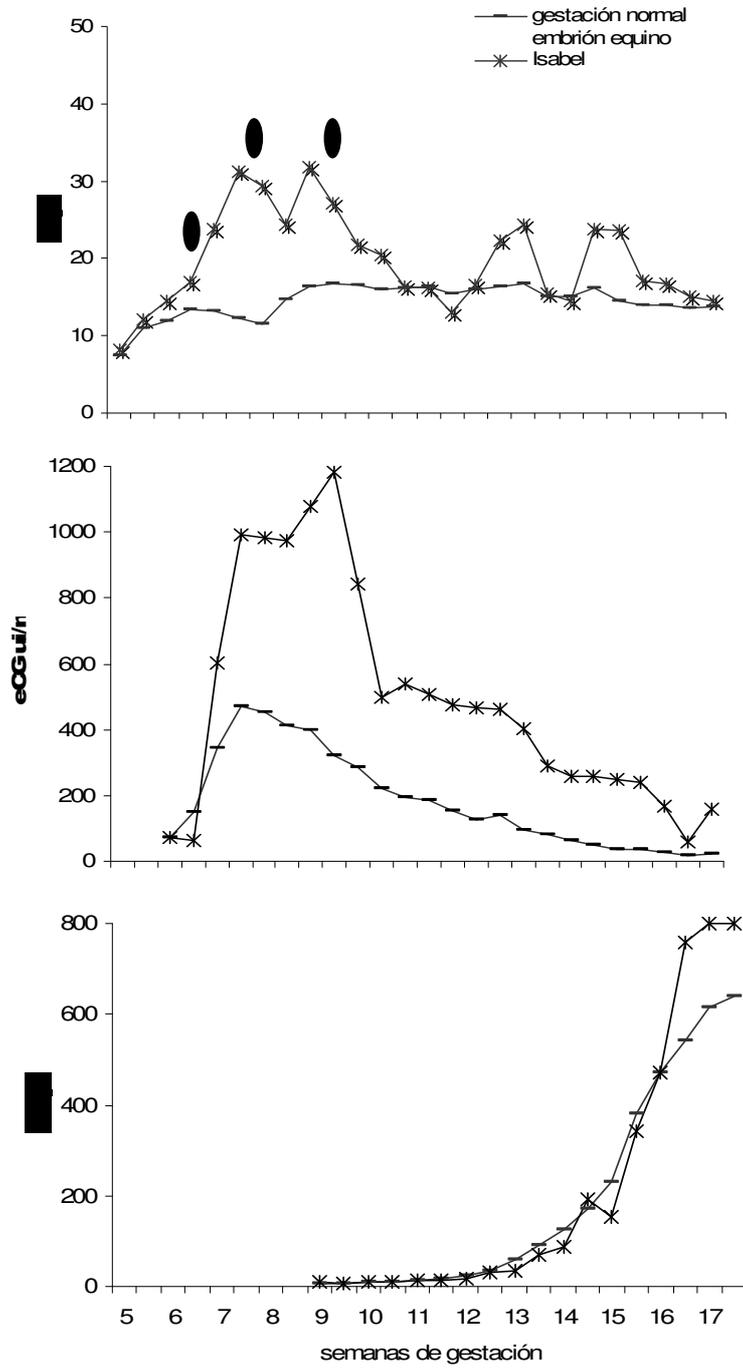












7.6 LITERATURA CITADA

Adams A, Oriol J, Campbell R, Oppenheim Y, Allen W, Antczak D. The effect of skin allografting on the equine endometrial cup reaction. *Theriogenology* 2007;68:237-247.

Albrecht BA, MacLeod JN, Daels PF. Differential transcription of steroidogenic enzymes in the equine primary corpus luteum during diestrus and early pregnancy. *Biol. Reprod.* 1997;56: 821-829.

Allen WR, Hamilton DW, Moor RM. The origin of equine endometrial cups. II. Invasion of the endometrium by trophoblast. *Anat. Rec* 1973;177:475-501.

Allen WR. Immunological aspects of the endometrial cup reaction and the effect of xenogenic pregnancy in horse and donkeys. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1982 ;31:57-94.

Allen WR. Hormonal control of early pregnancy in the mare. *Anim. Reprod. Sci.* 1984; 7: 283-304.

Allen WR, Kydd JH, Boyle MS, Antczak DF. Extraspecific donkey-in-horse pregnancy as a model of early fetal death. *J. Reprod. Fertil. Suppl* 1987;35:197-209.

Allen WR, Stewart MJ. Equine Chorionic Gonadotropin. In: McKinnon AO, Voss JL, editors. *Equine Reproduction*. Lea & Febiger. Philadelphia,USA;1993:81-96.

Allen WR, Skidmore JA, Stewart F, Antczak DF. Effects of fetal genotype and uterine environment on placental development in equids. *J. Reprod. Fertil.* 1993a.98; 55-60.

Allen WR, Kydd JH, Antczak DF. Interspecies and extraspecies equine pregnancies. In: McKinnon AO, Voss JL, editors. *Equine Reproduction*. Lea & Febiger Philadelphia.USA;1993b:533-553.

Allen WR. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. *Reprod. Dom. Anim.* 2001a 36:121-131.

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

Allen WR, Stewart F. Equine placentation. *Reprod. Fertil. Development.* 2001c;13: 623-634.

Bergfelt DR, Pierson RA, Ginther OJ. Resurgence of the primary corpus luteum during pregnancy in the mare. *Anim. Reprod. Sci.* 1989; 21:261-270.

Ball BA, Hillman RB, Woods GL. Survival of equine embryos transferred to normal and subfertile mares. *Theriogenology* 1987;28:167-174.

Ball BA. Embryonic death in mares. In: McKinnon AO, Voss JL. editors. Equine Reproduction. Lea & Febiger. Philadelphia.USA;1993:517-531.

Ball BA. Reduced Reproductive Efficiency in the Aged Mare: Role of Early Embryo Loss. In: Recent Advances in Equine Theriogenology, Publisher: International Veterinary Information Service 2000. (www.ivis.org).

Bergfelt DR, Woods JA, Ginther OJ. Role of the embryonic vesicle and progesterone in embryonic loss in mares. J.Reprod.Fert.1992;95:339-347.

Boeta M, Zarco QL. Utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas. Vet Mex.2000;31:67-69.

Boeta M, Zarco L. Progesterone and equine chorionic gonadotropin concentrations around the time of pregnancy loss in mares impregnated by donkeys or stallions. J. Eq. Vet. Sci. 2005;25 :531-538

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

Camillo F, Vannozzi I, Rota A, Di Luzio B, Romagnoli S, Aria G, Allen WA. Successful non-surgical transfer of horse embryos to mule recipients. Reprod. Dom. Anim. 2003;38:380-385.

Carnevale EM, Ginther OJ. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. Biol. Reprod. 1995;1:209-214.

Christakos S, Bahl OP. Pregnant mare serum gonadotropin purification and physicochemical, biological and immunological characterization. J. Biol. Chem. 1979; 254: 4253-4258.

Chopineau M, Martinat N, Marichatou H, Troispoux C, Auge-Gouillou C, Stewart F, Combarous Y, Guillou F. Evidence that the α -subunit influences the specificity of receptor binding of the equine gonadotrophins. J. Endocrinol. 1997;155: 241-245.

Daels PF, Albrecht BA, Mohammed HO. Equine chorionic gonadotropin regulates luteal steroidogenesis in pregnant mares. Biol. Reprod.1998; 59:1062-1068.

Daels PF, Stabenfeldt GH, Kindahl H, Hughes JP. Prostaglandin release and luteolysis associated with physiological and pathological conditions of the reproductive tract in the mare. A review.Equine Vet J Suppl 1989;8:29-34.

Daels PF, Shideler S, Lasley BL, Hughes JP, Stabenfeldt GH. Source of oestrogen in early pregnancy in the mare. J. Reprod. Fert. 1990 ; 90: 55-61.

Daels PF, Stabenfeldt GH, Hughes JP, Odensvik H, Kindahl H. Evaluation of progesterone deficiency as a cause of fetal death in mares with experimentally induced endotoxemia. *Am J Vet Res* 1991;52:282-8.

Davies CJ, Antczak DF, Allen WR. Reproduction in mules: Embryo transfer using sterile recipients. *Equine Vet J.Suppl.*1985;3:63-67.

Dehennin L, Petit E, Bonnaire Y, Bruyas J-F, Le Bizec B, Plou P. Urinary excretion of 5(10)-estrene-3 β ,17 α -diol and estrone by the female horse: Complementary indicators of early pregnancy screened with regard to a putative anabolic doping practice J. *Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2007;104:85-91.

Donadeu FX, Ginther OJ. Changes in concentrations of follicular fluid factors during follicle selection in mares. *Biol. Reprod.* 2002; 66: 1111-1118.

Donadeu FX, Watson ED. Seasonal changes in ovarian activity: Lessons learnt from the horse. *Anim. Reprod. Sci.* 2007;100 :225-242.

Evans MJ, Irvine CHG. The serum concentrations of FSH, LH and progesterone in the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1975;23:193-200.

Ginther OJ. Occurrence of anestrous, estrus, diestrus, and ovulation over a twelve-month period in mares. *Am. J. Vet. Res.* 1974;35:1173–1179.

Ginther OJ. *Ultrasonic Imaging and Reproductive Events in the Mare*.2nd ed. WI: Equiservices Cross Plains, USA, 1986. pp.195-217

Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. *Biol. Reprod.* 2005;73: 315-323.

Grubaugh W, Sharp DC, Berglund LA, McDowell KJ, Kilmer DM, Peck LS, Seamans KW. Effects of pinealectomy in pony mares. *J. Reprod. Fert.,Suppl.*1982;32:293-295.

Heap RB, Hamon MH, Allen WR. Oestrogen production by the preimplantation donkey conceptus compared with that of the horse and the effect of between-species embryo transfer. *J. Reprod. Fertil.* 1991;93 :141-147.

Henderson KM, Perkins NR, Wards RI, Stewart JI. Enzymeimmunoassay of estrone sulphate concentrations in faeces for non-invasive pregnancy determination in mares. *New Zeland Vet. Journal.*1999;47:61-66.

Henderson KM, Stevens S, Bailey C, Hall G, Stewart J, Wards R. Comparison of the merits of measuring equine chorionic gonadotrophin (eCG) and blood and faecal

concentrations of oestrone sulphate for determining the pregnancy status of miniature horses. *Reprod. Fertil. Dev.* 1998;10:441 - 444

[Holtan DW](#), [Squires EL](#), [Lapin DR](#), [Ginther OJ](#). Effect of ovariectomy on pregnancy in mares. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1979;27:457-463.

Jordao LP, De Camargo MX, Gouveia PF. Eficiencia, na reproducao, das éguas mulateiras da Coudelaria Paulista. *Bol.Industr.Animal.*1954;14:49-62.

Kindahl H, Knudsen O, Madej A, Edqvist LE. Progesterone, prostaglandin F-2 alpha, PMSG and oestrone sulphate during early pregnancy in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl* 1982;32:353-359.

Kilmer DM. Sharp DC. Berglund LA. Grubaugh W. McDowell KJ. Peck LS. Melatonin rhythms in pony mares and foals. *J. Reprod. Fert.,Suppl.*1982;32:303-307.

King A, Campbell E, Dille J, Roser L. Murphy K. Jones. Dopamine receptors in equine ovarian tissues. *Domestic Animal Endocrinology.* 2005;28: 405-415.

[Kydd J](#), [Miller J](#), [Antczak DF](#), [Allen WR](#). Maternal anti-fetal cytotoxic antibody responses of equids during pregnancy. *J. Reprod. Fertil.Suppl.*1982;32:361-369

Madej A, Kindahl H. Nydahl C, Edqvist L-E, Stewart DR. Hormonal changes associated with induced late abortions in the mare. *J. Reprod. Fert.* 1987; 35:479-484.

Malpaux B, Skinner DC, Maurice F. The ovine pars tuberalis does not appear to be targeted by melatonin to modulate luteinizing hormone secretion, but may be important for prolactin release. *J. Neuroendocrinol.* 1995;7:199-206.

*[Manning AW](#), [Rajkumar K](#), [Bristol F](#), [Flood PF](#), [Murphy BD](#). Genetic and temporal variation in serum concentrations and biological activity of horse chorionic gonadotrophin. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1987; 35:389-97.

Martinuk SD, Manning WA, Black DW, Murphy BD. Effect of carbohydrates on the pharmacokinetics and biological activity of equine chorionic gonadotropin *in vivo*. *Biol. Reprod.* 1991; 45:598-604.

Miller FK, Wesson JA, Ginther OJ. Interaction of estradiol and a nonsteroidal follicular fluid substance in the regulation of gonadotropin secretion in the mare. *Biol. Reprod.* 1981; 24:354-358.

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

Nagy P, Guillaume D, Daels P. Seasonality in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 2000;60-61:245-262.

Nakav S, Jablonka-Shariff A, Kaner S, Chadna-Mohanty P, Grotjan HE, Ben-Menahem D. The LH β gene of several mammals embeds a carboxyl-terminal peptide-like sequence revealing a critical role for mucin oligosaccharides in the evolution of lutropin to chorionic gonadotropin in the animal phyla. *J. Biol. Chem.* 2005; 280:16676-16684.

Palmer E, Driancourt AM, Ortavant R. Photoperiodic stimulation of the mare during winter anoestrus. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1982; 32:275-282.

Palmer, E. and Driancourt, M.A., 1983. Some interactions of season of foaling, photoperiod and ovarian activity in the equine. *Livest. Prod. Sci.* 1983;10:197–210.

Palmer E, Guillaume D. Photoperiodism in equine species-What is a long night? *Anim. Reprod. Sci.* 1992;28:21-30.

Pashen RL, Allen WR. The role of fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare. *J. Reprod. Fertil.* 1979; 27: 499-509.

Peltier MR, Robinson G. Sharp DC. Effects of melatonin implants in pony mares 1. Acute effects. *Theriogenology* 1998;49:1113-1123.

Pulido A, Zarco L, Galina CS, Murcia C, Flores G, Posadas E. Progesterone metabolism during storage of blood samples from gyr cattle: Effects of anticoagulant, time and temperature of incubation. *Theriogenology.* 1991;35: 965-975.

Roser JF, Papkoff H, Murthy HMS, Chang Y-S, Chloupek RC, Potes JAC. Chemical, biological and immunological properties of pituitary gonadotropins from the Donkey (*Equus asinus*): Comparison with the horse (*Equus caballus*). *Biol. of Reprod.* 1984;30: 1253-1262.

Roser JF. Equine Chorionic Gonadotropin. In: Knobil E, Neill JD, Editors. *Encyclopedia of Reproduction.* Academic Press, New York. Vol. 2. 1999;29-37.

Saint-Dizier M, Chopineau M, Dupont J, Daels P, Combarous Y. Expression and binding activity of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in the primary corpus luteum during early pregnancy in the mare. *Biol. Reprod.* 2003;69:1743-1749.

Saint-Dizier M, Chopineau M, Dupont J, Combarous Y. Expression of the full-length and alternatively spliced equine luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNAs in the primary corpus luteum and fetal gonads during pregnancy. *Reproduction* 2004; 128:219-228.

Seamans KW, Sharp DC. Changes in equine follicular aromatase activity during transition from winter anoestrus. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 1982;32:225-233.

Silvia PJ, Squires EL, Nett TM. Pituitary responsiveness of mares challenged with GnRH at various stages of the transition into the breeding season. *J. Anim. Sci.* 1987;64:790-796.

Sharp DC, Ginther OJ. Stimulation of follicular activity and estrous behavior in anestrus mares with light and temperature. *J. Anim. Sci.* 1975;41:1368-1372.

Sharp DC, Vernon MW, Zavy MT. Alteration of seasonal reproductive patterns in mares following superior cervical ganglionectomy. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 1979;27:87-93.

Sharp DC. Transition into the breeding season: Clues to the mechanisms of seasonality. *Equine Vet. Journal.* 1988;20:159-161.

Sharp DC, Grubaugh WR, Weithenauer J, Davis SD, Wilcox CJ. Effects of steroid administration on pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in ovariectomized pony mares in the early spring: pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone and pituitary gonadotropin content. *Biol. Reprod.* 1991;44:983-990.

Sherman GB, Wolfe MW, Farmerie TA, Clay CM, Threadgill DS, Sharp DC, Nilson JH. A single gene encodes the β subunits of equine luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *Mol. Endocrin.* 1992;6:951-959.

Squires EL, Ginther OJ. Collection technique and progesterone concentration of ovarian and uterine venous blood in mares. *J. Anim. Sci.* 1975;40: 275-281.

Smith PL, Bousfield GR, Kumar S, Fiete D, Baenziger JU. Equine luteinizing hormone and chorionic gonadotropin bear oligosaccharides terminating with SO₄-4-GalNAc and Sia α 2,3Gal, respectively. *J. Biol. Chem.* 1993;268:795-802.

Steel R, Torrie J. Principles and procedures of statistics. A biometrical approach. 2nd ed. McGraw-Hill. 1981;Singapore. pp.

Stewart F, Lennard SN, Allen WR. Mechanisms controlling formation of the equine chorionic gonadotropin. *Biol. Reprod. Monograph Series I*, 1995;151-159.

Strauss JF 3rd, Martinez F, Kiriakidou M. Placental steroid hormone synthesis: Unique features and unanswered questions. *Biol. Reprod.* 1996;54:303-311.

Terqui M, Palmer E. Oestrogen pattern during early pregnancy in the mare. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 1979;27:441-446.

Theingi M, Thway, Wolfe MW. An activator protein-1 complex mediates epidermal growth factor regulation of equine glycoprotein α subunit expression in trophoblast cells. *Biol. Reprod.* 2002;67:972-980.

Torrance MN, Donald WH, Estergreen VL. Plasma estrogens in pregnant and postpartum mares. *J. Anim. Sci.*1973;37:962-970.

Urwin VE, Allen WR. Pituitary and chorionic gonadotrophic control of ovarian function during early pregnancy in equids. *J. Reprod.Fert.,Suppl.*1982;32:371-381

Vanderwall DK, Newcombe JR. Early embryonic loss. In: Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO, Editors. *Current Therapy in Equine Reproduction*. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, 2007:374-383.

Vagnoni, KE, Ginther OJ, Lunn DP. Metalloproteinase activity has a role in equine chorionic girdle cell invasion. *Biol. Reprod.* 1995; 53(4):800-805.

Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J.Clin.Pathol.*1978;31:507-520.

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 ED, Bae SE, Steele M, Thomassen R, Pedersen HG, Bramley T., Hogg CO, David GA. Expression of messenger ribonucleic acid encoding for steroidogenic acute regulatory protein and enzymes, and luteinizing hormone receptor during the spring transitional season in equine follicles. *Domestic Animal Endocrinology* 2004 ; 26:215-230.

Webel SK, Squires EL. Control of estrous cycle in mares with altrenogest. *J.Reprod.Fert.Suppl.*1982;32:193-198.