



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**PAPEL DE LA GONADOTROPINA CORIÓICA
EQUINA EN LA ESTIMULACIÓN DE LA
ESTEROIDOGENESIS DURANTE LA GESTACIÓN
EQUINA**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A :

CHRISTIÁN DE JESÚS URÍAS CASTRO

TUTOR:

Phd. LUIS A. ZARCO QUINTERO

COMITÉ TUTORAL:

Phd. TERESA SÁNCHEZ TORRES

Dr. GERARDO PERERA MARÍN

MÉXICO, D.F.

2008



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.

DECLARACIÓN

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

Christián de Jesús Urías Castro

DEDICATORIAS

A mis padres:

Magdalena Castro López y Aureliano Urías Rodríguez por darme la vida y educarme de la manera que lo han hecho, enseñándome a trabajar para lograr mis metas y mostrarme los valores que han hecho de mí la persona que hoy en día soy.

A mis hermanos:

Flor y Cristo por la amistad y cariño que me han dado durante toda mi vida, los consejos y su compañía.

A mis amigos de siempre en la ciudad:

Ascensión, Mario, Miguel, Sol, Olga y Magda.

A mis amigos del “Rancho San Francisco”:

Gilberto, Estefany, Gabriela, Yahir, Eric, Zazil, De la rosa y Chava quienes me ayudaron durante mi trabajo de campo realizado en Chalco en el estado de México con quienes pase momentos muy bonitos que nunca voy a olvidar.

A mis amigos del Departamento de Reproducción:

Arnulfo, Álvaro, Ubaldo, Bety, Tóbele, Aracely, Mónica, Liliana, Adriana, Rosita, Abigail, Toño, Susana, Ana, Gissel, Memo y Brenda.

A los profesores del Departamento de Reproducción:

Dr. Luis Zarco, Dra. Miriam Boeta, Dr. Joel Hernández, Dra. Páramo y Dr. Alberto Balcazar

A mis amigos de la Facultad:

Ramón, Patricia, Omar, Blanca, Luis, Yolanda, Bruno, Mario, Paty, Mariana y Marco.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por permitirme dar un paso más en mi vida académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A los miembros de mi comité tutorial, los doctores Luis Alberto Zarco Quintero, Gerardo Perera Marin y Teresa Sánchez Torres. Gracias por la paciencia y confianza que me tuvieron durante la realización del proyecto.

A Susana Rojas, Anita Rodríguez y Clara Murcia, por el apoyo en las determinaciones hormonales en laboratorio.

Y muy en especial a la Dra Miriam Boeta Acosta, por el apoyo y sobre todo por su amistad brindada durante mi estudio de maestría y el trabajo de campo realizado en el "Rancho San Francisco".

RESUMEN

Papel de la gonadotropina coriónica equina en la estimulación de la esteroidogénesis durante la gestación equina. Urias CC, Boeta AM, Rojas MS, Rodríguez CA, Zarco L. El objetivo del presente trabajo fué evaluar el papel de la gonadotropina coriónica equina (eCG) en la estimulación de la secreción de progesterona, androstenediona, testosterona y estradiol durante los primeros 4 meses de la gestación equina. Se utilizaron 20 yeguas divididas al azar en dos grupos: Yeguas inseminadas con semen de caballo (n=10) y yeguas inseminadas con semen de burro (n=10), las cuales normalmente producen cantidades muy pequeñas de eCG. A partir del día 30 de la gestación se realizaron 2 veces a la semana ultrasonidos para determinar el número de cuerpos lúteos. También 2 veces a la semana se obtuvieron muestras de sangre. Se separó el plasma mediante centrifugación a 3,000 rpm durante 10 minutos. Las concentraciones de eCG, testosterona y estradiol se midieron mediante enzimo inmunoensayo (ELISA) en placas de micro titulación. Tanto las concentraciones de progesterona como la androstenediona se midieron por radioinmunoanálisis (RIA) en fase sólida. Se utilizó un análisis de varianza para mediciones repetidas para comparar las concentraciones semanales de andrógenos, estrógenos, progesterona y eCG entre grupos (yeguas servidas con caballo y yeguas servidas con burro). Las concentraciones de eCG siempre fueron mayores en las yeguas servidas con caballo que en las yeguas servidas con burro. Las diferencias entre ambos tipos de gestación fueron estadísticamente significativas entre la semana 7 y la semana 13 de la gestación ($p < 0.01$). Las concentraciones de progesterona siempre fueron mayores en las yeguas servidas con caballo que en las yeguas servidas con burro, siendo las diferencias entre los dos tipos de gestación estadísticamente significativas ($p < 0.05$) desde la semana 10 hasta la semana 17 de la gestación ($p < 0.01$). Las concentraciones promedio de androstenediona durante todo el periodo de muestreo fueron significativamente mayores en yeguas servidas con caballo que en yeguas servidas con burro ($p < 0.05$). Las concentraciones promedio de testosterona siempre fueron mayores en las yeguas con embrión equino que en las yeguas con embrión mula, siendo las diferencias entre ambos tipos de gestación significativas en las semanas 7, 9 y 10 ($P < 0.05$).

A través de modelos de regresión lineal que consideran los efectos lineales y cuadráticos de la semana de gestación y los efectos lineales y cuadráticos de las concentraciones de eCG, se determinó que las concentraciones de eCG circulantes tienen efectos importantes sobre la secreción de progesterona, androstenediona y testosterona, siendo los efectos más notorios en las yeguas servidas con caballo debido a su mayor secreción de eCG. En cuanto a las concentraciones de estradiol se observó que los valores predichos se ajustan adecuadamente a los reales sin necesidad de incluir los efectos de las concentraciones de eCG.

Se concluye que la eCG estimula la producción de progesterona, androstenediona y testosterona, pero no la de estradiol durante la gestación equina.

Palabras clave: esteroidogénesis, eCG, gestación equina, gestación mular

ABSTRACT

The role of equine chorionic gonadotropin in steroidogenesis stimulation during equine pregnancy. Urias CC, Boeta AM, Rojas MS, Rodriguez CA, Zarco L. The objective of the present work was to evaluate the role of equine chorionic gonadotropin (eCG) in the stimulation of progesterone, androstenedione, testosterone and oestradiol secretion during the firsts 4 months of equine pregnancy. Twenty mares were randomly divided assigned to two groups: The control group was formed by mares inseminated with stallion semen (n=10) and the experimental groups included mares inseminated with donkey semen (n=10), which normally produce very low quantities of eCG. Ultrasound examinations were carried out twice a week from day 30 to day 120 of pregnancy. Blood samples were also obtained twice a week and the plasma was separated by centrifugation at 3,000 rpm during 10 minutes. The concentrations of eCG, testosterone and oestradiol were measured by enzyme immuno assay (EIA) in microtitration plates. Progesterone and androstenedione concentrations were measured by solid-phase radioimmunoassay. Analysis of variance for repeated measures was used to compare the weekly concentrations of androgens, estrogens, progesterone and eCG between groups (mares served with stallion semen and mares served with donkey semen). The eCG concentrations were always higher in mares served with stallion than in mares served with donkey. The differences between both kind of pregnancies were statistically significant between the 7th and the 13th week of pregnancy ($p<0.01$). Progesterone concentrations were always higher in the mares served with stallion than in the mares served with donkey, the differences between the two kind of pregnancy being statistically significant ($p<0.05$) between the 10th week and the 17th week of pregnancy ($p<0.01$). The mean androstenedione concentrations during the whole sampling period were significantly higher in the mares served with stallion than in mares served with donkey ($p<0.05$). The mean concentrations of testosterone were always higher in the mares with equine embryo than in the mares with mule embryo, the differences between both types of pregnancy being significant on weeks 7, 9 and 10 ($P<0.05$). For each hormone a regression model that included the quadratic and lineal effects of the week of pregnancy week and the quadratic and lineal effects of the eCG concentrations was calculated. It was found that eCG concentrations have important effects on progesterone, androstenedione and testosterone secretion, the effects being more evident in the mares served with stallion due to their larger eCG production. On the other hand, oestradiol concentrations were adequately predicted without including the effects of eCG concentrations. It is concluded that during equine pregnancy eCG stimulates progesterone, androstenedione and testosterone secretion, but not oestradiol production.

Key words: steroidogenesis, eCG, equine pregnancy, mule pregnancy

CONTENIDO

	Página
DECLARACIÓN.....	I
DEDICATORIAS.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	3
3. OBJETIVOS.....	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
4.1 La gonadotropina coriónica equina y las copas endometriales.....	4
4.1.1 Estructura de la gonadotropina coriónica equina.....	5
4.1.2 La subunidad alfa.....	6
4.1.3 La subunidad beta de la gonadotropina coriónica equina.....	6
4.1.4 Glicosilación de la gonadotropina coriónica equina (eCG).....	7
4.1.5 Formación y desarrollo de las copas endometriales.....	8
4.1.6 Destrucción de las copas endometriales.....	11
4.1.7 Secreción de gonadotropina coriónica equina (eCG).....	13
4.1.8 Factores que afectan la secreción de eCG.....	14
4.1.9 Actividad biológica de la gonadotropina coriónica equina.....	15
4.1.10 Persistencia de la gonadotropina coriónica equina en la circulación...	17
4.1.11. Papel de la gonadotropina coriónica equina.....	19
4.2 Gonadotropina coriónica de burra (dCG).....	20
4.3 Endocrinología de la gestación equina temprana.....	21
4.3.1 Reconocimiento materno de la gestación.....	24
4.4 El cuerpo lúteo.....	25
4.4.1 Desarrollo del cuerpo lúteo	26
4.4.2 Vida media del cuerpo lúteo primario en yeguas.....	27

4.4.3 Formación y vida media de los cuerpo lúteos accesorios en yeguas.....	28
4.5 Hormonas esteroides.....	29
4.5.1 Fuentes de colesterol.....	30
4.5.2 Obtención del colesterol a nivel celular.....	30
4.5.3 Transporte de colesterol hacia la mitocondria.....	31
4.5.4 Conversión de colesterol a pregnenolona.....	32
4.6 Síntesis de hormonas esteroides a nivel ovárico.....	33
4.6.1 Produccion de progesterona lútea.....	33
4.6.2 Secreción de progesterona durante los primeros meses de la gestación equina.....	35
4.6.3 Producción de andrógenos ováricos.....	38
4.6.4 Producción de androstenediona.....	38
4.6.5 Secreción de androstenediona durante la gestación equina temprana.....	39
4.6.6 Biosíntesis de testosterona.....	40
4.6.7 Secreción de testosterona durante los primeros meses de gestación en la yegua.....	42
4.6.8 Producción de estrógenos a nivel ovárico.....	43
4.6.9 Patrón de secreción de estrógenos durante la gestación temprana en la yegua.....	45
5. MATERIAL Y METODOS.....	47
5.1 Localización.....	47
5.2 Animales y grupos experimentales.....	47
5.3 Muestreo sanguíneo y procesamiento de muestras.....	50
5.4 Análisis estadístico.....	51
6. RESULTADOS.....	52
7. DISCUSION.....	61
8. CONCLUSIONES.....	70
9. LITERATURA CITADA.....	71

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

- | | | |
|--------------------|--|--------------|
| Figura 1. | Diagrama que muestra las actividades llevadas a cabo durante el trabajo de campo en ambos grupos de animales. Dx Gx = Diagnóstico de gestación, Sem x = enumera las semanas consecutivas que desde la semana 5 hasta la semana 17. | Página
49 |
| Figura 5.1. | Concentraciones promedio de eCG entre la semana 5 y la semana 17 de la gestación en yeguas gestantes con embrión equino o con embrión mula. Las barras representan el error estándar. Los asteriscos indican las semanas en las que las concentraciones de eCG fueron diferentes entre los dos tipos de gestación ($p < 0.01$). | 52 |
| Figura 5.2. | Concentraciones promedio de progesterona entre la semana 5 y la semana 17 de la gestación en yeguas gestantes con embrión equino o con embrión mula. Las barras representan el error estándar. Los asteriscos indican las semanas en las que las concentraciones de progesterona fueron diferentes entre los dos tipos de gestación ($p < 0.05$). | 53 |
| Figura 5.3. | Concentraciones promedio de androstenediona entre la semana 5 y la semana 15 de la gestación en yeguas gestantes con embrión equino o con embrión mula. Las barras representan el error estándar. Las concentraciones promedio de androstenediona durante todo el periodo de muestreo son mayores en yeguas con embrión equino que en las yeguas con embrión mula ($P < 0.05$). Las diferencias en semanas específicas no son significativas ($P > 0.05$). | 54 |
| Figura 5.4. | Concentraciones promedio de testosterona entre la semana 5 y la semana 17 de la gestación en yeguas gestantes con embrión equino o con embrión mula. Las barras representan el error estándar. Los asteriscos indican las semanas en las que las concentraciones de testosterona fueron diferentes entre los dos tipos de gestación ($p < 0.05$). | 55 |

- Figura 5.5.** Concentraciones promedio de estradiol entre la semana 5 y la semana 17 de la gestación en yeguas gestantes con embrión equino o con embrión mula. Las barras representan el error estándar. Los asteriscos indican las semanas en las que las concentraciones de estradiol fueron diferentes entre los dos tipos de gestación ($p < 0.05$). 56
- Figura 5.6** Efecto de las concentraciones de eCG en la secreción de progesterona en yeguas gestantes con embrión equino grafica A o con embrión mula grafica B. En cada caso se muestran las medias mínimo cuadráticas reales de las concentraciones de progesterona, las concentraciones de progesterona (P4) predichas mediante una ecuación de regresión lineal que considera los efectos lineales y cuadráticos de la semana de gestación (sem y sem² respectivamente) y los efectos lineales y cuadráticos de las concentraciones de eCG (eCG y eCG² respectivamente). 57
- Figura 5.7** Efecto de las concentraciones de eCG en la secreción de androstenediona en yeguas gestantes con embrión equino grafica A o con embrión mula grafica B. En cada caso se muestran las medias mínimo cuadráticas reales de las concentraciones de androstenediona, las concentraciones de androstenediona (P4) predichas mediante una ecuación de regresión lineal que considera los efectos lineales y cuadráticos de la semana de gestación (sem y sem² respectivamente) y los efectos lineales y cuadráticos de las concentraciones de eCG (eCG y eCG² respectivamente). 58
- Figura 5.8** Efecto de las concentraciones de eCG en la secreción de testosterona en yeguas gestantes con embrión equino grafica A o con embrión mula grafica B. En cada caso se muestran las medias mínimo cuadráticas reales de las concentraciones de testosterona, las concentraciones de testosterona (P4) predichas mediante una ecuación de regresión lineal que considera los efectos lineales y cuadráticos de la semana de gestación (sem y sem² respectivamente) y los efectos lineales y cuadráticos de las concentraciones de eCG (eCG y eCG² respectivamente). 59

respectivamente).

Figura 5.9 Efecto de las concentraciones de eCG sobre la secreción de estradiol en yeguas gestantes con embrión equino grafica A o con embrión mula grafica B. En cada caso se muestran las medias mínimo cuadráticas reales de las concentraciones de estradiol, las concentraciones de estradiol (P4) predichas mediante una ecuación de regresión lineal que considera los efectos lineales y cuadráticos de la semana de gestación (sem y sem² respectivamente) y los efectos lineales y cuadráticos de las concentraciones de eCG (eCG y eCG² respectivamente).

60

PAPEL DE LA GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA EN LA ESTIMULACIÓN DE LA ESTEROIDOGENESIS DURANTE LA GESTACIÓN EQUINA

1. INTRODUCCIÓN

Durante las primeras semanas de gestación de la yegua ocurren oleadas de desarrollo folicular cada 10 a 12 días debido a la presencia de elevaciones periódicas de la hormona folículo estimulante (FSH). Los folículos dominantes que se desarrollan antes del día 30 de la gestación no llegan a ovular debido a que los niveles altos de progesterona impiden el desarrollo de una secreción preovulatoria de LH. Sin embargo, a partir del día 35 pueden producirse ovulaciones debido a la presencia de gonadotropina coriónica equina (eCG), la cual actúa en los receptores de LH de las células del folículo (Ginther, 1992a).

Como resultado de las ovulaciones que ocurren durante la gestación, a partir del día 35 en la mayoría de las yeguas se forma un cuerpo lúteo secundario, al cual se le pueden unir otros cuerpos lúteos suplementarios durante oleadas foliculares posteriores (Squires et al., 1974c).

Aparentemente la eCG no solamente provoca las ovulaciones accesorias y la formación de cuerpos lúteos secundarios, sino que también estimula tanto al cuerpo lúteo primario como a los secundarios para que mantengan su secreción de progesterona hasta el día 150 o 180 de la gestación, cuando sufren regresión debido a que deja de secretarse la eCG (Ginther y First, 1971; Squires et al., 1974b).

La eCG es producida en estructuras denominadas copas endometriales, que se forman a partir de células que se desprenden del cinturón coriónico del embrión y se insertan y proliferan en el endometrio. Las concentraciones de eCG se elevan inicialmente entre los días 35 y 40 de la gestación, alcanzando un pico alrededor del día 60, después de lo cual se reducen gradualmente hasta desaparecer alrededor del día 180 debido al rechazo inmunológico de las copas endometriales (Roser y Lofstedt, 1989). Durante el periodo en el cual la eCG está presente en la circulación, tanto el cuerpo lúteo primario como los secundarios

producen niveles más altos de progesterona debido al efecto luteotrópico de la eCG (Allen, 2001). Sin embargo, al parecer el efecto de la eCG en los cuerpos lúteos no se limita a estimular la producción de progesterona, sino que también los estimula para que produzcan mayores cantidades de andrógenos y estrógenos. Así, se ha encontrado que la elevación en los niveles de testosterona y androstenediona que ocurre a partir del día 35 en la yegua gestante es paralela a los aumentos de la eCG (Daels et al., 1996, 1998). También se ha observado una correlación muy marcada entre la secreción de eCG y la producción de estradiol en la yegua gestante (Urwin y Allen, 1982).

Se han realizado diversos estudios para evaluar los efectos de la eCG en la esteroidogénesis lútea, que incluyen la administración exógena de eCG a yeguas con un cuerpo luteo funcional, así como a yeguas a las que previamente se les había provocado la lisis del cuerpo lúteo (Daels et al., 1995,1998) y a yeguas ovariectomizadas entre el día 18-19 de la gestación (Daels et al., 1990). También se han realizado estudios para determinar los efectos de la eCG en la actividad de las enzimas esteroidogénicas en el tejido lúteo (Rodger et al., 1998; Sirois et al., 1991).

Sin embargo, hasta ahora no se ha evaluado si la deficiencia natural de eCG durante la gestación afecta las concentraciones de andrógenos y estrógenos circulantes en la yegua. Este tipo de estudio se puede realizar mediante la utilización de un modelo natural de gestación deficiente en eCG, la yegua inseminadas con burro, en la cual se produce un rechazo prematuro de las copas endometriales, por lo que se forman copas muy pequeñas y que se destruyen muy rápidamente (Allen, 1982; Allen y Stewart, 1993; Allen et al., 1993; Allen., 2000) lo que trae como consecuencia concentraciones muy bajas o nulas de eCG en la circulación materna. Boeta y Zarco (2005), demostraron que las bajas concentraciones de eCG en las yeguas servidas con burro provocan que en estos animales se produzca significativamente menos progesterona que en las yeguas inseminadas con caballo. Sin embargo, no se ha determinado si la deficiencia de eCG también resulta en concentraciones reducidas de andrógenos y estrógenos.

2. HIPÓTESIS

Las bajas concentraciones de eCG encontradas durante la gestación en yeguas inseminadas con burro se reflejarán en concentraciones más bajas de andrógenos, estrógenos y progesterona que los encontrados en yeguas inseminadas con caballo. Adicionalmente, se postula que dentro de cada tipo de gestación, a mayor producción de eCG mayor será la estimulación lútea y por lo tanto habrá una producción mayor de hormonas esteroides.

3. OBJETIVOS

El objetivo de este estudio fué comparar las concentraciones de eCG, progesterona, androstenediona, testosterona y estradiol entre el día 35 y el día 120 de la gestación en yeguas inseminadas con caballo y yeguas inseminadas con burro, evaluando además la correlación entre las concentraciones de eCG y las hormonas esteroides.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 LA GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA Y LAS COPAS ENDOMETRIALES

Cole y Hart (1930) reportaron que al obtener suero de 64 yeguas en diferentes etapas de gestación e inyectarlo a ratas y ratones inmaduros, se estimuló el crecimiento ovárico. Los autores observaron que si el suero equino era recolectado antes del día 37 de la gestación no se producían efectos en las ratas inoculadas, mientras que el suero recolectado entre los días 37 y 42 inducía una respuesta gonadal pronunciada. La máxima estimulación gonadal se presentaba cuando el suero equino era obtenido entre los días 43 a 80 de la gestación, y los efectos podían seguirse mostrando con suero obtenido hasta el día 131 de la preñez. Del mismo modo publicaron que existía respuesta escasa o casi nula si el suero era recolectado en los 210 días restantes de la gestación. El elemento que estimulaba los ovarios recibió el nombre de PMSG (pregnant mare serum gonadotropin). Posteriormente la hormona fue aislada del suero (Gospodarowicz y Papkoff, 1967) y de las copas endometriales de yeguas gestantes (Papkoff et al., 1978).

Inicialmente se asumió que la PMSG era producida por la hipófisis equina, pero más tarde se comprobó que esta glicoproteína era de origen fetal y que era producida por las células del cinturón coriónico que invaden el endometrio formando las estructuras denominadas copas endometriales (Allen y Moor, 1972). Basado en el origen trofoblástico de las células que producen la hormona, se decidió que el nombre gonadotropina coriónica equina (eCG) es más apropiado para describir a la glicoproteína producida por las copas endometriales de la yegua gestante.

La gonadotropina coriónica ha sido purificada tanto en la yegua como en la burra y puede ser encontrada en híbridos de estas dos especies (Clegg et al., 1982). También se ha encontrado en otros équidos, su secuencia de aminoácidos no es idéntica entre especies, por lo que la hormona es denominada con

referencia a su especie de origen, por ejemplo: la de caballo es gonadotropina coriónica equina (eCG) y la de burra es gonadotropina coriónica de burra (dCG).

Químicamente la eCG es una glicoproteína de alto peso molecular (72 KDa) (Gospodarowicz, 1971) similar a la hormona luteinizante equina (eLH). Ambas hormonas consisten de dos subunidades distintas, la α y la β (Papkoff et al., 1978; Licht et al., 1980). Una característica inusual en la gonadotropina coriónica equina es su alto contenido de carbohidratos, que es el más alto entre todas las hormonas glicoproteicas, lo que permite que persista más tiempo en la circulación (Manzella et al., 1995).

En especies distintas a los équidos la eCG tiene la capacidad de producir efectos tanto de FSH como de LH (Stewart et al., 1976). Por esta razón y por ser fácil su obtención a partir de suero de yeguas gestantes, ha sido ampliamente utilizada en forma comercial como un potente inductor de la superovulación en animales domésticos.

4.1.1 ESTRUCTURA DE LA GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA

La eCG es una hormona glicoproteica heterodimérica constituida por dos cadenas polipeptídicas (subunidades α y β) unidas de manera no covalente, (Legardinier et al., 2005a). La secuencia de aminoácidos (estructura primaria) de la eCG es idéntica a la de la LH equina (Bousfield et al., 1996), por lo que ambas hormonas se unen al receptor de LH/CG (eLH/CG-R) en los tejidos equinos (Stewart y Allen, 1979, 1981; Guillou y Combarnous, 1983).

Las subunidades alfa de la eCG y la LH son codificadas por el mismo gen (Smith et al., 1993). De la misma manera la subunidad beta de la eCG y la LH equina son codificadas por un mismo gen (Smith et al., 1993). Sin embargo, al expresarse los genes de las cadenas α y β en la hipófisis se produce la LH, mientras que al expresarse en las células de la placenta se produce una hormona distinta, la eCG, debido a que en cada uno de estos tejidos se produce un patrón diferente de glicosilación de las cadenas polipeptídicas.

4.1.2 LA SUBUNIDAD ALFA

Todas las hormonas glicoprotéicas de una determinada especie comparten la misma subunidad alfa, por lo que existe un solo gen para la subunidad alfa de cada especie. Ward et al. (1982) describieron la subunidad alfa de las hormonas glicoprotéicas de equinos, concluyendo que consta de 96 aminoácidos y es similar a la subunidad alfa de las glicoproteínas placentarias y pituitarias de otras especies (Pierce y Parsons, 1981). Stewart et al. (1987) aislaron y clonaron el cDNA de la subunidad alfa de la yegua, demostrando que la secuencia de nucleótidos es idéntica para todas las hormonas glicoprotéicas hipofisarias y para la eCG.

4.1.3 LA SUBUNIDAD BETA DE LA GONADOTROPINA CORIÓICA EQUINA

A diferencia de lo que ocurre con la subunidad alfa, la secuencia de aminoácidos de la subunidad β es distinta para cada una de las hormonas glicoprotéicas de una determinada especie, y son estas diferencias las responsables de que cada hormona tenga una actividad biológica diferente (Pierce y Parsons, 1981). Sin embargo, las secuencias de aminoácidos de la subunidad beta de la eCG y la subunidad beta de la LH equina son idénticas (Bousfield et al., 1987; Sugino et al., 1987), por lo que las diferencias en su actividad biológica se deben exclusivamente a sus diferentes patrones de glicosilación. La subunidad beta de la LH equina y la eCG están constituidas por 149 aminoácidos (Legardinier et al., 2005a).

Un solo gen codifica tanto la subunidad beta de la LH como la de la eCG (Stewart y Maher, 1990; Sherman et al., 1992), pero la hipófisis y la placenta glicosilan en forma diferente a la cadena de aminoácidos.

4.1.4 GLICOSILACIÓN DE LA ECG

La glicosilación de las glicoproteínas en mamíferos juega un papel muy importante en la persistencia de estas hormonas en la sangre (Legardinier et al., 2005b). La eGC es la más glicosilada de todas las glicoproteínas hipofisarias y placentarias de los mamíferos (Couture et al., 1993), con aproximadamente el 45% de su masa atribuible a sus carbohidratos (Papkoff, 1978; Papkoff et al., 1978; Damm et al., 1990; Legardinier et al., 2005b). Tanto la subunidad α como la β están glicosiladas en sitios de unión de asparagina (glicosilación - N) y sitios de unión de treonina-serina (unión-O) (Legardinier et al., 2005b). Los puntos de glicosilación son similares a los observados en otras hormonas glicoprotéicas (Bahl et al., 1984; Baezinger y Green, 1988), pero la cantidad y la composición de los carbohidratos difiere (Baezinger y Green, 1988).

Los polisacáridos unidos a la eGC presentan moléculas de hexosas, hexosaminas y ácido siálico distribuidos de manera diferente en las subunidades α y β (Schams y Papkoff, 1972) ya que la galactosa, glucosamida y ácido siálico son 4 veces más abundantes en la cadena β (Papkoff et al., 1978). Otros estudios muestran que la subunidad α de la eGC contiene el 22% de los carbohidratos y la cadena β el 78 % (Chirstakos y Bahl, 1979).

La subunidad beta de eGC está constituida en más del 50 % de su masa por carbohidratos (Bahl et al., 1984; Sugino et al., 1987; Damm et al., 1990). El contenido de carbohidratos difiere entre la eCG y la LH y esta diferencia radica principalmente en las terminaciones de los oligosacáridos unidos a asparagina (Smith et al., 1993). La eCG muestra oligosacáridos de tres ramas unidos a Asn, con una terminación química Sia α 2, 3 o 6Gal β 1, 4GlcNAc. En contraste, en la LH más del 72% de los oligosacáridos unidos a asparagina tienen una o dos ramas terminando con una secuencia SO₄-4-GalNAc β 1, 4GlcNAc (Smith et al., 1993). De esta manera, una de las diferencias más importantes entre las dos hormonas la constituye la alta proporción de terminaciones constituidas por ácido siálico en la eCG. La cantidad de ácido siálico por mg de eCG varía no solo entre yeguas, sino

también dependiendo de la etapa de gestación en la misma yegua (Manning et al., 1987; Manning, 1989). La eGC obtenida de las copas endometriales tiene un contenido mayor de carbohidratos que la obtenida del suero de la yegua (Martinuk et al., 1990b; Matteri et al., 1986; Aggarwal et al., 1980a, 1980b). Esta heterogeneidad en los patrones de glicosilación también ha sido encontrada en otras hormonas glicoprotéicas y se piensa que confiere diferentes propiedades biológicas a las distintas formas de cada hormona (Stockwell-Hartree, 1989).

El alto contenido de ácido siálico de la eCG es responsable de su larga vida en la circulación. Además, la diferencia en el contenido de carbohidratos entre la LH-equina y la eCG parece influir en la afinidad por el receptor de LH/eCG en las dos hormonas (Murphy y Martinuk, 1991). Es posible que la carga negativa debida al alto contenido de ácido siálico de la cadena beta de eCG ejerza un efecto repulsivo en cuanto a la unión de la hormona al receptor, por lo que la afinidad de la eCG por el LH/CG-R es mucho menor que la de la LH (Couture et al., 1993).

4.1.5 FORMACIÓN Y DESARROLLO DE LAS COPAS ENDOMETRIALES

El trofoblasto equino está claramente dividido en dos componentes: uno de carácter invasivo, y otro no invasivo. Alrededor del día 25 de la gestación, cuando el embrión tiene aun forma casi esférica, comienza a formarse en el trofoblasto una banda de tejido especializado llamado cinturón coriónico, que rodea al trofoblasto a lo largo de la línea que se forma en el sitio de contacto entre el alantoides y el saco vitelino (Allen et al., 1973). En el día 33 el cinturón coriónico esta formado por pliegues que aumentan en número y se proyectan hacia el interior de las vellosidades uterinas. El espacio que se forma entre las vellosidades se llena de material extracelular que sirve de adherencia entre las superficies coriónica y la uterina (Allen et al., 1973). En esta etapa la unión firme entre la vesícula embrionaria y el endometrio, involucra solamente al cinturón coriónico. Una estirpe de células del cinturón coriónico adquiere propiedades invasivas.

Estas células se desprenden del cinturón coriónico y se incrustan en el endometrio para dar lugar a la formación de copas endometriales, que son la estructuras responsables de secretar eCG (Thway et al., 2001). Estas células binucleadas que forman el cinturón son de naturaleza invasiva, y para el día 36 o 37 se han separado del córion, penetrando en el epitelio uterino para establecerse en el estroma endometrial (Allen et al., 1973).

Para el día 38, una vez establecidas en el endometrio, las células coriónicas continúan invadiéndolo, secuestrando y rodeado a las células epiteliales. La invasión cesa después de la infiltración inicial en el estroma endometrial, pero las células coriónicas proliferan y forman estructuras macroscópicas llamadas copas endometriales, las cuales producen la eCG (Murphy y Martinuk, 1991; Allen, 2000). Las copas endometriales se observan como una serie de protuberancias endometriales ulceradas, organizadas alrededor del concepto (Allen et al., 1987). Histológicamente consisten en una masa firme de células epiteliales grandes y binucleadas, intercaladas ocasionalmente con vasos sanguíneos y una porción fúndica dilatada de la glándula endometrial. La porción apical es obliterada durante la invasión de las células del cinturón corionico.

Las copas endometriales crecen gradualmente para alcanzar su tamaño máximo y su máxima capacidad secretora entre los días 60 y 70 de gestación (Allen, 2000). La secreción de eCG es constitutiva y no se afecta por hormonas tales como la GnRH, la cual regula la liberación de LH y FSH por los gonadotropos (Thompson et al., 1982). Hacia el final del segundo mes de gestación las copas endometriales varían en tamaño desde pequeñas estructuras circulares de 1-2 mm de diámetro, hasta estructuras de 3-5 cm de ancho y más de 30 cm de largo (Allen., 2000). El desarrollo de las copas endometriales y la cantidad de eCG que secretan depende entre otras cosas de la configuración del endometrio al momento de ser invadido por el cinturón coriónico (Allen., 2000), del genotipo del embrión y de la compatibilidad inmunológica entre los tejidos del embrión y los de la madre (Knobil y Neil, 1998)

Una vez iniciada su formación las copas endometriales continúan funcionando por 60 a 100 días, durante los cuales se forman debajo de cada copa grandes cavidades linfáticas en las que comienzan a concentrarse linfocitos CD4 y CD8 (Kydd et al., 1991), además de células plasmáticas, macrófagos y eosinófilos (Grunig et al., 1995), que se acumulan en el estroma y la periferia de la copa endometrial (Allen, 1975).

Esta acumulación de células del sistema inmune se debe a que las células invasivas del cinturón corionico, pero no las células no invasivas del alantocorion, expresan en su superficie gran cantidad de antígenos paternos del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I), los cuales no son reconocidos como propios por la madre. La expresión de estos antígenos comienza desde antes de que estas células invadan el endometrio materno para formar las copas endometriales (Crump et al., 1987; Donaldson et al., 1990). La expresión de antígenos decrece entre los días 40-45 y se pierde entre los días 50 y 60 (Donaldson et al., 1992; Vagnoni et al., 1996). Los antígenos MHC clase I estimulan una respuesta humoral fuerte por parte de la madre, lo que ocurre de manera semejante en todas las yeguas, incluyendo las primigravidas (Donaldson et al., 1990).

La mayoría de los fetos portan antígenos MHC-I que difieren inmunológicamente o son incompatibles con los de la madre. En estos casos la madre desarrolla altos títulos séricos de anticuerpos específicos contra los antígenos paternos de las copas endometriales dentro de los 10 a 14 días posteriores al desarrollo inicial de dichas estructuras (Antczak et al., 1982; Kydd et al., 1982; Allen et al., 1987). Los anticuerpos persisten durante toda la gestación y su concentración en el suero incrementa marcadamente durante la etapa temprana de la gestación. La respuesta inmunológica es más rápida en yeguas preñadas con el mismo semental durante años sucesivos (Crump et al., 1987), así como en yeguas a las cuales se les transplantaron biopsias de piel del semental antes de la cruce (Crump et al., 1987).

Por otra parte, se ha demostrado que el trofoblasto tiene la capacidad de evadir la respuesta inmune materna independientemente del estado fisiológico de la gestación (Adams y Antczak, 2001), lo que sugiere la presencia de un mecanismo inmunomodulador durante la gestación que impide que la respuesta inmune en contra de las copas endometriales se haga extensiva al resto del embrión.

Durante una gestación de yegua servida con caballo (embrión equino), las copas endometriales tienen una vida media similar y secretan cantidades de eCG equivalentes en yeguas que son incompatibles o compatibles al MHC-I de su feto (Allen et al., 1983). En cambio, la respuesta leucocitaria montada contra las copas endometriales es mucho más intensa y destructiva en yeguas que portan fetos mula (gestación interespecífica o híbrida de yegua con burro) (Allen y Short, 1997), que en las yeguas que portan fetos de caballo (gestación intraespecífica) (Allen et al., 1987b). Lo anterior afecta el desarrollo de las copas endometriales, pues al transferir embriones de burro a yeguas las células trofoblásticas del cinturón coriónico se desarrollan menos comparadas con las producidas por un feto caballo (Enders et al., 1996).

4.1.6 DESTRUCCIÓN DE LAS COPAS ENDOMETRIALES

En la gestación normal de caballo con yegua las copas endometriales se empiezan a degenerar después de día 70 de la gestación debido a la muerte de las células de la zona central de la depresión luminal (Allen, 2000) asociada a la infiltración de leucocitos en el tejido de la copa endometrial, los cuales atacan y destruyen a las células de dicha estructura (Allen, 1975). Esta reacción inmune comienza poco tiempo después de formarse las copas, y consiste en una acumulación progresiva de linfocitos T que es seguida por infiltración de linfocitos B, macrófagos, eosinófilos y células plasmáticas en el tejido endometrial que rodea cada copa (Kydd et al., 1991). Aunado a esto se produce una reacción inmunocelular acompañada de la aparición de anticuerpos citotóxicos dirigidos en

contra de antígenos paternos tipo I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), de las células de las copas endometriales (Kydd et al., 1991).

Conforme las copas endometriales son atacadas por el sistema inmune de la madre se vuelven cada vez más pálidas y con apariencia caseosa. El material exócrino acumulado es liberado y mezclado con los detritus celulares necróticos, para formar un coágulo pegajoso de color miel, rico en actividad de eCG (Rowlands, 1963), que se acumula en la depresión central de la copa y se pega a la superficie del alantocorion subyacente. Eventualmente, entre los días 100 y 140 de la gestación la copa endometrial necrótica entera es separada de la superficie del endometrio, de una manera histológicamente similar al rechazo sufrido por un injerto en la piel (Allen et al., 1987).

En el caso de gestación intraespecífica entre yegua y caballo los leucocitos empiezan a invadir la copa endometrial y a destruir sus células a partir del día 80 de la gestación, mientras que en las gestaciones híbridas de burro con yegua los leucocitos de la yegua comienzan a atacar a las células endometriales desde el día 50 de la gestación (Allen et al., 1984), por lo que para el día 60 o 70 han sido completamente destruidas. La cruce experimental entre yeguas y caballos con antígenos muy compatibles evita el rechazo inmunológico de las copas endometriales, por lo que en esos casos la eCG permanece detectable en la circulación hasta el día 230 o 265 de gestación (Spincemaille et al., 1975).

La influencia del genotipo fetal en el desarrollo de las copas endometriales también se ha demostrado en gestaciones extraspecíficas realizadas por transferencias de embriones (Allen y Stewart, 2001). Por ejemplo, la transferencia de un embrión equino a una burra resulta en el desarrollo adecuado del cinturón coriónico y en la formación de copas endometriales grandes y activas (Allen y Stewart, 2001). En contraste, si se transfiere un embrión burro a una yegua el desarrollo de las copas endometriales es defectuoso, ya que las células del corion del embrión burro fallan en su misión de invadir el endometrio materno en el día 36 a 38, por lo que se forman copas endometriales pequeñas y poco activas (Allen y Stewart, 2001). Esto es seguido por una implantación inadecuada, y generalmente

se produce el aborto antes del día 100 de la gestación (Allen, Skidmore, Stewart et al., 1993). De esta manera, el útero equino aparentemente inhibe el desarrollo de las copas endometriales de cualquier embrión con genotipo burro, mientras que el útero de la burra permite el desarrollo de las copas endometriales de cualquier embrión con genotipo caballo, por lo que se piensa que el útero de burra es más permisible que el útero de la yegua en términos de aceptar gestaciones inter y extraespecies.

4.1.7 SECRECIÓN DE GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA (eCG)

La secreción de eGC persiste después de la remoción del feto, sugiriendo que una vez formadas las copas endometriales funcionan independientemente de lo que ocurra con el feto. (Lofstedt, 1986).

El patrón de aparición de eGC en el suero se correlaciona con el tamaño de las copas endometriales (Allen, 1975) y los cambios histológicos que sufren (Ginther, 1979). Las copas alcanzan su máximo desarrollo y tamaño alrededor del día 60 de gestación, coincidiendo con los máximos niveles de secreción de eCG. Los niveles séricos de eCG no sufren cambios episódicos (Thompson et al., 1982) como los que sufren las gonadotropinas hipofisarias, por lo que tiene un patrón tónico de secreción distinto al patrón pulsátil de las hormonas hipofisarias. En yeguas ponis, ni el tratamiento con estrógenos ni con andrógenos afectan a la eGC circulante, por lo que al parecer la secreción de eCG no está sujeta a control por retroalimentación (Nett y Pickett, 1979).

La primera elevación de la eCG coincide con la migración de células coriónicas especializadas hacia el endometrio (Allen y Moore, 1972). Las concentraciones de eCG se elevan inicialmente en el día 40 (Ginther, 1992a; Squires, 1993) alcanzando un pico en el día 60 (Allen, 1969; Farmer y Papkoff, 1979; Ginther, 1992a; Squires, 1993) después de lo cual bajan a niveles basales para el día 200 (Roser y Lofstedt, 1989; Knobil y Neil, 1998).

Aunque las copas endometriales actúan principalmente como una glándula endócrina (Ginther 1992b), también actúan como una glándula exocrina desde el día 42, pues una proporción importante de la eCG sale de las glándulas uterinas hacia el espacio ubicado entre la copa y el alantocorion (Ginther, 1992b). Es probable que la eCG secretada hacia la luz uterina pueda alcanzar la circulación feto-placentaria y sea responsable de estimular la hipertrofia de las gónadas fetales y la esteroidogénesis de dichos órganos entre el día 60 y los días 120-150 de la gestación (Saint-Dizier et al., 2004).

4.1.8 FACTORES QUE AFECTAN LA SECRECIÓN DE ECG

La concentración de eGC detectable en el suero varía entre razas y entre individuos (Day y Rowlands, 1947; Bielanski et al., 1956; Hamilton et al., 1973). En general las yeguas de razas pesadas o de carga tienen niveles más bajos de eGC que las de razas ligeras.

Las concentraciones circulantes de eGC son considerablemente más bajas en burras que en yeguas (Allen, 1985). La cantidad de eCG y la duración de la secreción de eGC son afectadas por el semental (Clegg et al., 1982; Allen, 1982), indicando que existe un efecto del genoma paterno sobre la secreción de esta hormona. En parte, la variación en las concentraciones de CG entre especies (burra y yegua) y entre híbridos (mula y burdégano) puede ser atribuida al tamaño de las copas endometriales. En la burra las copas son pequeñas y angostas. En las gestaciones de yeguas servidas por burro (producto mula), la secreción de CG es pobre, y las copas se desarrollan menos (Allen, 1982). En gestaciones de burra con caballo (producto burdégano), las copas endometriales se desarrollan grandes y gruesas, produciendo grandes cantidades de CG (Allen, 1982).

El semental tiene efectos demostrables sobre la producción de CG en cruzamientos intraespecíficos. Este efecto se demostró en un estudio hecho en 227 gestaciones de 177 yeguas de carga o de talla grande cruzadas al azar con 12 sementales diferentes (Murphy et al., 1985), encontrándose que una proporción

importante de la variabilidad en los niveles circulantes de eGC entre los días 40 y 100 de gestación fue atribuible al semental. Los sementales pudieron ser clasificados en dos grupos bien definidos: los que produjeron gestaciones con altos niveles de eCG y los que produjeron gestaciones con niveles más bajos. La influencia del semental en las concentraciones de eGC también fue confirmada en otro estudio hecho con 100 yeguas (Bell, 1985).

La yegua también influye profundamente sobre la cantidad de eGC presente en la circulación. Un componente de la variabilidad en las concentraciones de eGC en el suero de las yeguas puede atribuirse a la yegua misma (Martinuk et al., 1990a), lo que teóricamente puede permitir seleccionar yeguas con producción elevada de eGC. Algunas yeguas prácticamente no producen eCG, independientemente de que semental sea usado para cubrirlas (Boeta y Zarco, 2005).

Se ha considerado que en parte la capacidad de producir eGC de una yegua depende del grado de convolución y la consecuente área de superficie del endometrio disponible para el establecimiento y desarrollo de las copas endometriales (Allen, 1982). El número de fetos presentes en el útero tiene influencia sobre la producción de eGC, con mayores niveles presentes en el suero de las yeguas que tienen gestaciones gemelares (Rowlands, 1949).

4.1.9 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA

La eCG se une a los receptores de LH en el equino (Licht et al., 1979; Stewart y Allen, 1979), aunque esto ocurre con una afinidad diez veces menor que la de la LH equina por el mismo receptor (Stewart y Allen, 1981; Guillou y Combarnous, 1983). La reducida capacidad de unión de la eGC comparada con la LH equina, se encontró de manera independiente en tres laboratorios distintos. Este aspecto es intrigante pues las dos hormonas tienen total homología en cuanto a sus secuencias de aminoácidos (Bousfield et al., 1987; Sugino et al., 1987). La diferencia de afinidad se debe a su diferente composición de carbohidratos, pues

la eCG está más glicosilada (Matteri y Papkoff, 1987), lo que sugiere que el contenido de carbohidratos en la eCG de algún modo inhibe su unión con el receptor de LH equino.

Una alternativa sería que la población de receptores en la gónada equina podría ser heterogénea y los diferentes sitios de unión podrían discriminar entre la LH la eCG. En apoyo a este punto de vista, Sairam et al. (1988) demostraron que el receptor de LH ovino tiene sitios que pueden distinguir entre LH y eGC equina. Sin embargo, la actividad de la eCG en la propia especie que la produce es principalmente de LH. La eCG no se une a receptores de FSH en los folículos equinos (Guillou y Combarous, 1983), ni en el testículo de la misma especie (Moore y Ward, 1980), sugiriendo que en el equino la eCG tiene actividad exclusivamente de LH. En cambio, en la burra la eCG se une a receptores de FSH con la misma afinidad que a receptores de LH (Guillou y Combarous, 1983), (Stewart y Allen, 1981).

Un estudio de radiorreceptores específicos para FSH y LH en testículo de rata para medir la tasa de actividad FSH:LH de las gonadotropinas coriónicas producidas en gestaciones de yegua, burra, mula y burdégano (Stewart et al., 1977), indicó que el genotipo del feto influye marcadamente sobre la proporción de actividad FSH: LH de la gonadotropina coriónica. La proporción de FSH:LH de la gonadotropina coriónica producida por un feto caballo fue de 1, mientras que la gonadotropina coriónica producida por un feto burro tuvo una proporción de actividad FSH de tan solo 0.2. Por otro lado, los híbridos o fetos mula y burdégano produjeron una gonadotropina coriónica con una proporción de actividad FSH:LH intermedia entre la de caballo y burro (Stewart et al., 1977).

Otro estudio demostró que la subunidad β de la eCG determina el nivel de actividad de FSH mientras que la unidad α determina el nivel de actividad de LH (Chopineau et al., 1997). El estudio muestra los cambios de actividad tanto de FSH como de LH sufridos por la hormona al ser recombinada con otras subunidades α y β de burra y de humano. Se ha demostrado que la secuencia de

aminoácidos presente en la subunidad α es responsable de la bioespecificidad tanto de la LH como de la eCG (Chopineau et al., 2004).

Por otro lado se observó que el grado de glicosilación O en la subunidad β también contribuye a que se de una diferencia substancial entre la LH equina y la eCG en cuanto a su capacidad de unión a receptores de LH (Bousfield et al., 2001). El ovario de la yegua responde al estímulo de la eCG a través de su unión al receptor de LH, pero la afinidad de unión es menos de una décima parte de la afinidad entre la LH y su receptor (Saint-Dizier et al., 2003).

Debido a su extensiva glicosilación, la eCG muestra una heterogenicidad significativa. Dependiendo del grado de glicosilación se producen cambios en su capacidad de unión a los receptores de LH y FSH. Entre mayor sea el grado de glicosilación menor será la afinidad a los receptores, mientras que una menor glicosilación aumentará la capacidad de unión de la eCG a los receptores (Butnev et al., 1996)

4.1.10 PERSISTENCIA DE LA GONADOTROPINA CORIÓNIC EQUINA EN LA CIRCULACIÓN

El alto grado de glicosilación de la eCG equina resulta en su persistencia en la sangre de la yegua y otras especies por periodos muy largos comparados con otras hormonas glicoproteicas. En estudios realizados para evaluar el papel del ácido siálico en la vida media de la eCG se encontró que la desialización de la eCG resulta en una eliminación mas rápida solo si se remueve por lo menos el 80% de su contenido de ácido siálico (Manning, 1989; Martinuk et al., 1991), lo que resulta en una vida media de menos de una hora. Si la remoción es del 20% al 50% la vida media de la eCG no es afectada. Kamerling et al. (1990), atribuyeron la larga vida media de la eCG a que las terminaciones de ácido siálico de los polisacáridos son relativamente resistentes a la acción de la enzima neuraminidasa.

El primer reporte sobre de eliminación de eCG indicaba que tenía una vida media de 6 días en animales castrados y de 24-26 horas en la circulación del conejo (Catchpole et al., 1935). Cole y colaboradores en 1967 reportaron que solo el 1% de la eCG podía ser encontrada en la orina y un 0.2% en la leche, lo que los condujo a concluir que la mayoría de la eCG (+85%) es metabolizada y degradada en la circulación en vez de ser filtrada por los riñones. Por Radioinmunoensayo se ha confirmado que la orina de yeguas gestantes en el día 90 contiene muy poca eCG comparada con la contenida en el suero (Farmer y Papkoff, 1979).

En un estudio hecho en ovejas inyectadas con eCG, la vida media de la hormona fue de 21.2 +/- 1.1 h (McIntosh et al., 1975). La fase de distribución de esta hormona hacia los tejidos es de 0.3 h en la rata (Aggarwal y Papkoff, 1985), de 3-4 h en la oveja y de 45.6 h en la vaca. La vida media de eliminación es de 6 horas en ratas (Aggarwal y Papkoff, 1985), de 61 h en la oveja (Murtinuk et al., 1990b) y de 121 h en la vaca (Schams et al., 1978).

La remoción de un 99% del ácido siálico de la eCG con tratamientos de neuraminidasa hizo que se eliminara más rápido en la rata (Aggarwal y Papkoff, 1985). A mayor remoción del ácido siálico la distribución de la eCG a los tejidos fue mas rápida (Manning, 1989). Lo anterior demuestra que el alto contenido de ácido siálico presente en la eCG es responsable en gran parte de la vida media tan prolongada en la circulación. Al parecer el alto peso molecular de la hormona y su carga eléctrica negativa aportada por el ácido siálico impiden que sea filtrada por los glomérulos renales (Legardinier et al., 2005a).

La vida media en la circulación de las glicoproteínas es controlada principalmente por los carbohidratos terminales de los oligosacáridos unidos al aminoácido asparagina. Estos oligosacáridos son únicos en estas hormonas, cuya terminación y secuencia es $\text{SO}_4\text{-4-GalNAc}\beta\text{1, 4GlcNAc}$ (Manzella et al., 1995).

4.1.11 PAPEL DE LA GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA DURANTE LA GESTACIÓN

Tradicionalmente se considera que la función de la eCG es la de formar y mantener los cuerpos lúteos secundarios que aparecen a partir del día 40 de la gestación (Amoroso et al., 1948). Estas estructuras son derivadas de la ovulación o de la luteinización de folículos ováricos (Ginther, 1992b).

Una vez formados, tanto el cuerpo lúteo primario como los secundarios persisten hasta el día 160-180 de la gestación (Ginther., 1992b) y continúan secretando progesterona durante este tiempo (Squires y Ginther, 1975a). Los folículos cuya ovulación resulta en la formación de los primeros cuerpos lúteos secundarios se desarrollan antes de que se dé la invasión del endometrio por las células del cinturón coriónico, por lo que la foliculogénesis es independiente de la eCG (Allen, 1975), la cual solamente se requiere para provocar la ovulación y luteinización de los folículos (Urwin y Allen, 1982).

Alrededor del día 39 de la gestación los niveles de eGC en la yegua están en el rango de $1-5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de suero (Martinuk et al., 1990a), mientras que los niveles de LH asociados a la oleada preovulatoria del ciclo estral son de alrededor de $5-130 \text{ ng.ml}^{-1}$ (Ginther, 1979). Los niveles tan elevados de eCG en la yegua parecen ser suficientes para inducir la ovulación/luteinización en la yegua gestante a pesar de tener mucha menor afinidad por los receptores de LH/CG en las gónadas que la LH equina (Stewart y Allen, 1981).

Las elevaciones en la concentración de progesterona en la yegua a partir del día 35 de la gestación, antes de que se hayan formado cuerpos lúteos secundarios, están asociadas con el inicio de secreción de eGC (Stewart y Allen, 1981), lo que sugiere un papel luteotrópico de la GC equina en la manutención del cuerpo lúteo primario y no solamente de los secundarios. En apoyo a esta hipótesis, la eCG estimula in vitro la producción de progesterona por parte de cuerpos lúteos primarios y de cuerpos lúteos secundarios derivados de folículos ovulados y no ovulados (Squires et al., 1979).

Se concluye que función de la eCG es la de inducir la formación y luteinización del cuerpo lúteo secundario, además de servir como agente luteotrópico tanto para el cuerpo lúteo primario como para el secundario. Al parecer la eGC y las estructuras lúteas accesorias actúan como un sistema redundante para asegurar el mantenimiento de la gestación hasta que la placenta asuma esta función y sea capaz de producir progestágenos esenciales para la gestación.

4.2 GONADOROPINA CORIÓNICA DE BURRA (dCG)

Se ha demostrado que existen diferencias entre las gonadotropinas secretadas por la yegua y las secretadas por la burra; al administrarse a otras especies la primera expresa una mayor proporción de actividad FSH que la gonadotropina coriónica de burra (dCG) (Stewart et al., 1977).

A diferencia de la eCG, la dCG actúa predominantemente como LH en pruebas biológicas (Farmer y Papkoff, 1979). En ensayos in vitro de células de Leydig (que miden actividad LH), la dCG fue tan potente como la eCG, pero en ensayos in vitro de túbulos seminíferos de rata para evaluar la actividad FSH la dCG fue menos potente que la eCG (1-10%) (Aggarwal et al., 1980b). En ensayos con radiorreceptores específicos de ratas para LH y FSH la dCG mostró ser 10 veces más potente en su actividad como LH comparada con la actividad de FSH mostrada por la misma (Aggarwal et al., 1980b).

La dCG tiene menos carbohidratos totales (31%) y menos ácido siálico (6.8%) que la eCG (45 y 10.2% respectivamente) (Aggarwal et al., 1980b). El análisis terminal de aminoácidos mostró la presencia de solo un residuo amino-terminal, la fenilalanina en la dCG, en vez de los dos (fenilalanina y serina) encontrados en la eCG (Aggarwal et al., 1980a). El análisis de aminoácidos de la dCG reveló una gran similitud con la eCG en su composición pero se encontró que la dCG tiene más tirosina y un poco menos residuos de arginina (Aggarwal et al., 1980b).

Los niveles de dCG secretados en la burra son mucho menores que los niveles de eCG secretados por la yegua (Allen, 1975).

El menor contenido en carbohidratos y ácido siálico en la dCG sugiere que tiene una vida media menor que la eCG, lo que explica las concentraciones menores de gonadotropinas coriónicas encontradas en el suero de burras en el día 60 de gestación que las encontradas en el suero de las yeguas con el mismo tiempo de gestación (10-20 vs 50-150 U.I.ml⁻¹ Allen, 1975).

4.3 ENDOCRINOLOGÍA DE LA GESTACIÓN EQUINA TEMPRANA

La yegua es una especie poliéstrica estacional que presenta varios ciclos estrales en el transcurso de la temporada reproductiva (Gigli et al., 2006). Se le denomina fototrópica positiva por aumentar su actividad ovárica-folicular en la época del año en la cual hay una mayor cantidad de horas luz (Ginther et al., 2004b), por lo que la estación reproductiva se manifiesta generalmente a fines de la primavera y durante el verano (Ginther et al., 2004b). Después de un anestro invernal las yeguas entran en un periodo de transición caracterizado por una actividad cíclica errática antes de ingresar al periodo de actividad sexual regular y fértil (Donadeu y Watson, 2007).

El ciclo estral se define como el periodo que abarca desde una ovulación hasta la siguiente, con cada ovulación acompañada por signos de estro y concentraciones plasmáticas de progesterona menores a 1 ng.ml⁻¹ (Blanchard et al., 2003). El ciclo estral en una yegua que se encuentre en época reproductiva fisiológica dura de 21 a 22 días (con rangos de 18 a 24 días). La duración del estro va de los 4 a los 7 días, mientras que la duración del diestro es de 14 a 15 días (Blanchard et al., 2003).

La actividad ovárica esta regulada principalmente por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Blanchard et al., 2003), la cual es controlada a su vez de manera negativa por la melatonina (más melatonina = menos GnRH), la producción de melatonina es inhibida por las horas luz del día, respondiendo a

variaciones en cantidad y en dirección durante el año (Donadeu y Watson, 2007). Lo anterior da como resultado que a mayor cantidad de horas luz disminuya la secreción de melatonina y aumente la liberación de GnRH y con esto se liberen gonadotropinas tales como la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), que promueven el comportamiento reproductivo en la yegua (Gigli et al., 2006).

El ciclo estral está bajo un control delicado de una serie de hormonas producidas en la glándula pineal, el hipotálamo, la hipófisis, los ovarios y el endometrio (Blanchard et al., 2003).

Las células neurosecretoras en el hipotálamo producen el GnRH. Los axones de estas células se proyectan al espacio perivascular de la eminencia media, en el origen del tallo hipofisiario y episódicamente liberan GnRH hacia el sistema porta-hipotalámico-hipofisiario, el cual transporta la hormona a la hipófisis anterior (Gigli et al., 2006). El GnRH estimula la síntesis y liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) por parte de la hipófisis anterior (Gigli et al., 2006). Estas hormonas entran a la circulación sistémica y al llegar a el ovario, el cual es su órgano blanco, la FSH estimula el reclutamiento folicular mientras que la LH es responsable de madurar el folículo y causar la ovulación, así como de luteinizar al cuerpo lúteo (Blanchard et al., 2003).

Después de la ovulación (día 0), e independientemente de si se fecunda el gameto u óvulo producido, la propia ovulación da lugar a la formación de un cuerpo lúteo (CL). Si el óvulo no es fertilizado, el CL formado recibe el nombre de CL del diestro, el cual en la yegua tiene un periodo de vida que abarca del día 5 al 14 (Gigli et al., 2006). Este cuerpo lúteo se forma en la cavidad que deja el folículo ovulatorio, primero como un cuerpo hemorrágico el cual posteriormente es invadido por células de diferente tipo, entre las que destacan las células de la granulosa y las de la teca, que dan origen respectivamente a células lúteas grandes y pequeñas (Niswender et al., 2000).

Después del día 16 en la yegua vacía los niveles de progesterona bajan significativamente (Squires et al., 1974b) ya que en ausencia del embrión el útero

produce $\text{PGF2}\alpha$, que es un agente luteolítico muy potente responsable de destruir el cuerpo lúteo (Arosh et al., 2004). Para ello es necesario que el útero desarrolle receptores para oxitocina, ya que esta hormona estimula la secreción de $\text{PGF2}\alpha$ por el endometrio (Watson et al., 1997; Stout et al., 2000), la que a su vez estimula la secreción de más oxitocina, produciéndose una retroalimentación positiva entre oxitocina y $\text{PGF2}\alpha$ que lleva a la destrucción del cuerpo lúteo. En la yegua la oxitocina es secretada por el endometrio, a diferencia de lo que ocurre en rumiantes en los que el cuerpo lúteo es quien secreta oxitocina (Díaz et al., 2002).

Al darse el reclutamiento folicular a la mitad del diestro (Ginther et al., 2005a), empieza a crecer de manera sincronizada un grupo de folículos (oleada folicular) y uno de ellos será seleccionado para convertirse en el folículo dominante el cual inicialmente tiene un diámetro aproximado de 22.5 mm, en promedio (Ginther et al., 2004c; Ginther et al., 2005a). El folículo dominante secreta estradiol en grandes cantidades conforme crece (Spicer et al., 2005). También produce inhibina, que junto con los estrógenos inhibe la secreción de FSH, por lo que las concentraciones de FSH comienzan a bajar (Gastal et al., 1999a; Ginther et al., 2005b). El folículo dominante además produce IGF-1 libre y activina A en cantidades mayores que otros folículos, lo cual le da la capacidad de convertirse en dominante y continuar creciendo (Beg y Ginther, 2006). La inhibina es una hormona que específicamente inhibe la secreción de FSH (Ginther et al., 2004b), lo que favorece la regresión de los otros folículos seleccionados para crecer (Bergfelt et al., 2001). El folículo dominante desarrolla receptores para LH en las células de la granulosa, lo que le da la capacidad de ser estimulado por la LH hipofisaria, dejando de ser dependiente de la FSH. La LH estimula el desarrollo final del folículo dominante hasta un tamaño aproximado de 40 mm (Ginther et al., 2004b). En estos momentos el folículo dominante produce altos niveles de estradiol (Gastal et al., 1999b), con valores que van de los 18 a los 20 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ en promedio (Daels et al., 1991). Estos estrógenos provocan en la yegua las características del estro. Una vez alcanzado el tamaño ovulatorio el folículo ovulará por efecto del aumento gradual de LH, lo que permite la salida del óvulo, el

cual en el caso de la yegua es expulsado hacia la fosa de ovulación (Gigli et al., 2006).

Si el óvulo es fecundado se forma el embrión y el cuerpo lúteo formado recibe el nombre de cuerpo lúteo de la gestación, el cual a diferencia del cuerpo lúteo del diestro no regresa en el día 14 a 16 (Zarco y Boeta, 2000), siendo por medio de un mecanismo denominado reconocimiento materno de la gestación que involucra un diálogo químico entre la yegua y el embrión (Allen, 2001a).

4.3.1 RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA GESTACIÓN

El reconocimiento materno de la gestación permite que se mantenga la gestación y se continúe produciendo progesterona mas allá del día en el que normalmente ocurre la regresión del cuerpo lúteo en las yeguas vacías (Blanchard et al., 2003; Gastal et al., 2005). Short (1969) fue el primero en utilizar la frase “reconocimiento materno de la gestación” al describir las distintas estrategias utilizadas por las especies animales para asegurar la continuidad de la vida y la función secretora del cuerpo lúteo mas allá de su tiempo de vida durante el ciclo estral, lo que hace posible mantener el útero en un estado progestacional para apoyar la gestación. A partir del día 5 después de la ovulación el embrión secreta PGE2 (Allen, 2001a) lo que estimula la motilidad de las fibras musculares del oviducto para permitir el paso del embrión hacia el útero. Una vez en el útero, la PGE2 del embrión estimula movimientos del miometrio que mantienen al embrión en movimiento constante, siendo transportado por todo el útero y pasando de un cuerno al otro hasta 20 veces al día (Ginther, 1998) hasta el día 16 o 17 (Allen, 2001a). Las contracciones uterinas son mayores en los sitios en los cuales el endometrio se encuentra en contacto con el embrión (Ginther, 1998), lo que lo impulsa a cambiar de sitio.

Para evitar la secreción de PGF2 α el embrión produce un factor que inhibe su secreción, pero también es indispensable la continua movilidad del embrión para permitir que el factor antiluteolítico entre en contacto con toda la superficie

del útero, lo que suprime la regulación positiva de los receptores de oxitocina que se presenta entre los días 10 a 16 después de la ovulación (Allen, 2001b), por lo que las concentraciones de receptores para oxitocina entre los días 10 y 16 son mucho más reducidas en yeguas gestantes que en las yeguas cíclicas (Starbuck et al., 1998), lo que impide el establecimiento de un patrón de retroalimentación positiva entre oxitocina y PGF2 α .

Como ya se mencionó la movilidad del embrión resulta indispensable para que ocurra el reconocimiento de la gestación por parte de la yegua (Allen, 2000), ya que permite que las sustancias antiluteolíticas producidas por el embrión hagan contacto con toda la superficie uterina bloqueando la síntesis de PGF2 α en todo el endometrio (Blanchard et al., 2003). La capacidad del embrión equino de secretar tanto PGF2 α como PGE2 in vitro (Stout y Allen, 1996) probablemente ayuda al movimiento del embrión por todo el útero. En apoyo a esta afirmación, cuando una yegua gestante es inyectada con meglumina (Finadyne, Schering Plough, Middlesex) el cual es un inhibidor sintético de la síntesis de PGF2 α , lo que ocasiona que el embrión pierda motilidad, se detenga y deje de producir prostaglandinas (Stout et al., 2000). Sin embargo, el cuerpo lúteo no se destruye porque el endometrio tampoco es capaz de producir la PGF2 alfa (Stout et al., 2000).

4.4 EL CUERPO LÚTEO

El cuerpo lúteo es un tejido complejo formado por células esteroideogénicas pequeñas y grandes, así como por células no esteroideogénicas tales como fibroblastos, células endoteliales y células inmunes. Su rápido crecimiento una vez ocurrida la ovulación es comparado con el crecimiento exagerado que se presenta en los tumores. El desarrollo y regresión del cuerpo lúteo involucra una remodelación extensiva que requiere de procesos celulares específicos, incluyendo mitosis, migración, diferenciación y apoptosis. Aunque la LH y la prostaglandina F2 α son los factores endocrinos primarios que controlan la función

del cuerpo lúteo (Webb et al., 2002), muchos otros factores locales están involucrados, como el sistema IGF (factor de crecimiento parecido a la insulina), IGFBPs (proteínas de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina), VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), factores angiogénicos y células inmunes, las que producen otros factores como el MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos) que desempeñan papeles claves para el desarrollo y función del cuerpo lúteo. (Webb et al., 2002).

La función principal del cuerpo lúteo es secretar la hormona que mantiene la gestación en los mamíferos, la progesterona. A las 10-12 horas post-ovulación el cuerpo lúteo de la yegua ya produce altas concentraciones de progesterona (Gigli et al., 2006).

4.4.1 DESARROLLO DEL CUERPO LÚTEO

La hormona luteinizante (LH) secretada por la hipófisis anterior es fundamental para el desarrollo y el funcionamiento normal del cuerpo lúteo en la mayoría de los mamíferos, aunque en algunas especies también participan la hormona del crecimiento, la prolactina y el estradiol (Niswender et al., 2000; Díaz et al., 2002).

Después de la ovulación, el cuerpo lúteo se forma a partir de las células residuales de la teca y de la granulosa. En el caso de la yegua, después de la ovulación las células de la teca interna sufren atresia, mientras que las células de la granulosa se diferencian en células lúteas grandes que se convierten en las principales células productoras de esteroides (Harrison, 1946; Van Niekerk et al., 1975). Aunque las células de la teca tienen un desempeño pobre en cuanto a su producción de progesterona y estradiol, es en ellas donde se sintetiza la mayor parte de los andrógenos que serán aromatizados por las células de la granulosa (Sirois et al., 1991).

Un aspecto esencial del desarrollo lúteo inicial es rápida tasa de proliferación celular y de crecimiento del tejido. En ovejas el tejido folicular que queda después de la ovulación, que pesa 40 mg, se transforma en pocos días en

un cuerpo lúteo que pesa de 600 a 700 mg (Niswender et al., 2000). Este crecimiento se presenta por el aumento de aproximadamente dos veces el tamaño de las células lúteas grandes, por un aumento en el número de células lúteas pequeñas y por proliferación de fibroblastos y de las células endoteliales.

El (VEGF), un mitógeno específico de las células endoteliales, es probablemente el regulador principal de la proliferación de las células endoteliales del cuerpo lúteo durante sus primeros días de vida (Charnock-Jones y Smith, 1998). La LH induce la expresión de VEGF en folículos preovulatorios y células aisladas de la granulosa y la inmunoneutralización del VEGF anula la actividad mitogénica de las células endoteliales en el cuerpo lúteo en desarrollo (Charnock-Jones y Smith, 1998).

La proliferación de las células endoteliales es un requisito para la neovascularización durante el desarrollo lúteo, lo que provoca la formación de una extensa red capilar en el cuerpo lúteo para sostener la tasa de flujo sanguíneo al cuerpo lúteo ($6-10 \text{ ml } \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), que excede la cualquier otro tejido (Charnock-Jones y Smith, 1998). Además, la mayor parte (59 %) de las membranas de las células lúteas está en contacto directo con los capilares, mientras que otro porcentaje importante (37%) está en contacto con el espacio intersticial cercano a capilares. Este estrecho contacto con la circulación se debe a las altas demandas metabólicas del cuerpo lúteo, el cual consume de dos a seis veces más oxígeno por unidad de peso que el hígado, el riñón o el corazón (Niswender et al., 2000). En la yegua el cuerpo lúteo y por ende el ovario, son indispensables durante los primeros 70 días de la gestación e importantes entre el día 70 y el día 140, después del cual la gestación continúa sin problema si se realiza la ovariectomía (Holtan et al., 1979).

4.4.2 VIDA MEDIA DEL CUERPO LÚTEO PRIMARIO EN YEGUAS

La alta afinidad de la LH por sus receptores en las células lúteas permite que el cuerpo lúteo se mantenga activo pese a las bajas concentraciones de LH

circulante durante el diestro y la gestación temprana (Gigli et al., 2006). El primer cuerpo lúteo (cuerpo luteo primario) se forma en el sitio de la ovulación a partir de la cual se originó la gestación y es mantenido hasta el día 160 a 180 de la gestación (Squires et al., 1974a). Durante todo este período produce progesterona para colaborar en el mantenimiento de la gestación.

El cuerpo lúteo de yeguas histerectomizadas tiene una vida más corta que la duración de la gestación, ya que regresa hacia el día 140 (Squires et al., 1974a), lo que difiere de lo que ocurre en otras especies. Por ejemplo la remoción del útero en vacas y en borregas resulta en el mantenimiento de la función lútea por un periodo equivalente o más largo que la gestación (Anderson et al., 1969). Bolt (1966) comparó el peso del cuerpo lúteo de borregas gestantes y borregas histerectomizadas en los días 50, 100, 120, 130, 140 y 150, siendo los pesos medios en cada etapa similares entre las borregas gestantes y las histerectomizadas, lo que sugiere que durante la gestación no se producen hormonas luteotrópicas específicas, sino que simplemente se evita la luteolisis. En contraste con la borrega, en la yegua gestante es evidente la presencia de una sustancia luteotrópica, presumiblemente la eCG, ya que a partir del día 35 de la gestación el cuerpo lúteo primario es más grande y más activo que el de una yegua histerectomizada en etapa similar.

4.4.3 FORMACIÓN Y VIDA MEDIA DE LOS CUERPO LÚTEOS ACCESORIOS EN YEGUAS

Los cuerpos lúteos secundarios y accesorios se forman debido a las oleadas de FSH que ocurren cada 10 o 12 días durante la gestación, estimulando el crecimiento folicular (Urwin y Allen, 1982). A partir del día 35 de la gestación, la presencia de eCG estimula la ovulación, o la luteinización sin ovulación, de algunos de los folículos dominantes formados en diversas oleadas (Allen y Stewart, 2001).

El primer cuerpo lúteo secundario se forma aproximadamente al mismo tiempo que comienza la secreción de eCG (Bergfelt et al., 1989; Allen, 2005), entre los días 40 a 60 y en etapas posteriores se pueden formar cuerpos lúteos accesorios adicionales. Todos los cuerpos lúteos suplementarios sufren regresión aproximadamente al mismo tiempo que el cuerpo lúteo primario, entre el día 160 a 180 de la gestación (Squires et al., 1972; Squires et al., 1975a; Holtan et al., 1979).

Tanto el cuerpo lúteo primario como los suplementarios persisten más allá de la mitad de la gestación, cuando la placenta ya está lo suficientemente desarrollada para encargarse de manera satisfactoria del suministro de la progesterona necesaria para mantener la gestación exitosamente hasta su término (Cole et al., 1931; Amoroso et al., 1948).

Tanto el cuerpo lúteo primario como los que se forman posteriormente durante la gestación se mantienen en los ovarios estimulados por la acción luteotrópica de la eCG (Allen y Stewart, 1993; Rodger et al., 1998).

4.5 HORMONAS ESTEROIDES

Las hormonas esteroides se sintetizan en las glándulas adrenales, gónadas, placenta y el sistema nervioso central (Stocco, 2000a), además de el tejido adiposo (Sanderson, 2006). El precursor para la producción de las hormonas esteroides es el colesterol (Stocco, 2000a), a partir del cual se sintetizan los glucocorticoides, los mineralocorticoides, los progestágenos, los andrógenos y los estrógenos. En el presente trabajo se evalúa el papel de la eCG en la estimulación de la secreción ovárica de progestágenos, andrógenos y estrógenos, por lo que a continuación se revisan diversos aspectos de la regulación de la síntesis de cada uno de estos grupos hormonales.

4.5.1 FUENTES DE COLESTEROL

Bajo condiciones normales la mayor parte del colesterol se sintetiza en el hígado y es transportado asociado a lipoproteínas a los órganos esteroideogénicos (corteza adrenal, folículo ovárico, cuerpo lúteo, testículos, placenta). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL), son la fuente más común de colesterol utilizada para la producción de hormonas esteroideas en el cuerpo lúteo, el cual cuenta con receptores especializados para su captura (Díaz et al., 2002).

Bajo condiciones de privación de lipoproteínas (reducción en la síntesis de proteínas o en la mayoría de las condiciones in vitro), las células lúteas son capaces de sintetizar colesterol de novo a partir del acetato, pero en condiciones normales la mayoría del colesterol usado en la esteroideogénesis se obtiene de la sangre en forma de LDL o HDL (Díaz et al., 2002).

4.5.2 OBTENCIÓN DEL COLESTEROL A NIVEL CELULAR

Las LDL aportan el colesterol para la síntesis de hormonas esteroideas, siendo captadas por las células esteroideogénicas por medio de endocitosis una vez que se han asociado a su receptor en la membrana celular. Los endosomas que contienen a las LDL en el interior de las células se fusionan con los lisosomas, cuyas enzimas degradan a las proteínas y desesterifican el colesterol (Díaz Chico, 2004). El colesterol libre que procede de las LDL bloquea la síntesis de novo de colesterol por la propia célula ovárica, siendo eventualmente re-esterificado y acumulado en gotitas lipídicas en el citoplasma celular (Díaz Chico, 2004). Cuando deba ser utilizado, el colesterol será desesterificado nuevamente y liberado de la gotita lipídica en el primer paso de la síntesis de cualquiera hormona esteroide (Díaz Chico, 2004).

4.5.3 TRANSPORTE DE COLESTEROL HACIA LA MITOCONDRIA

La síntesis de todos los esteroides depende en forma absoluta del transporte de colesterol desde el citoplasma hasta la membrana mitocondrial interna (Devoto et al., 2002), donde el complejo enzimático colesterol P450_{SCC}, corta la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona (Watson et al., 2000). Varias proteínas se encuentran involucradas en el transporte del colesterol hacia el interior de la mitocondria, entre ellas esta proteína transportadora SCP (sterol carrier protein), el receptor benzodiazepina periférico y la proteína StAR (Stocco, 2001). El principal punto de regulación del transporte es la proteína StAR (Christenson y Devoto, 2003). Este paso también parece ser el sitio principal de regulación positiva y negativa de la esteroidogénesis por sistemas de segundos mensajeros (Christenson y Strauss, 2001).

Las hormonas gonadotrópicas como la LH estimula la producción de la proteína STAR en sus células blanco (Christenson y Strauss, 2001). En condiciones basales esta proteína se encuentra en niveles muy bajos tanto en las células de la granulosa como en las células de la teca (Kiriakidou et al., 1996; Pescador et al., 1996; Chaffin et al., 2000), aumentando considerablemente en presencia de LH. Los niveles de la proteína StAR en las células esteroidogénicas del ovario se reducen considerablemente cuando a una yegua se le suprime su producción de LH mediante la aplicación de un antagonista de GnRH (Cetrorelix) (Devoto et al., 2001). Durante la gestación la eCG estimula la expresión de mRNA para la síntesis de STAR (Watson et al., 2000).

En diversas especies se ha demostrado que la aplicación de una dosis luteolítica de PGF2 α causa un decremento en los niveles expresión del gen que codifica la proteína StAR (Sandhoff y Maclean, 1999; Díaz et al., 2002). El papel crítico jugado por la StAR en la esteroidogénesis fué documentado claramente por Lin et al. (1995), quienes demostraron que la reducción severa en la síntesis de esteroides adrenales y gonadales que se presenta en pacientes con hiperplasia adrenal lipoide congénita se debe a mutaciones en el gen StAR.

Como se mencionó anteriormente, además de la proteína StAR, otras proteínas juegan un papel importante en el transporte de colesterol hacia la mitocondria. Tal es el caso del receptor periférico de tipo benzodiazepina PBR (Papadopoulos et al., 1997), que se encuentra en la membrana de la mitocondria de las células productoras de esteroides (Díaz et al., 2002), así como también el polipéptido inhibidor de la unión de diacepam o DBI, y el ligando interno del PBR (Papadopoulos et al., 1997). La eliminación dirigida del gen del receptor PBR en las células esteroideogénicas reduce drásticamente la secreción de hormonas esteroides, lo cual se revierte si los receptores son reintroducidos a la célula (Papadopoulos et al., 1997).

4.5.4 CONVERSIÓN DE COLESTEROL A PREGNENOLONA

Una vez transportado a la matriz mitocondrial, el colesterol es atacado por el sistema enzimático P-450_{scc}, teniendo como resultado la producción de pregnenolona (Boerboom y Sirois, 2001). El sistema enzimático P450_{scc}, también llamado 20-22 desmolasa, corta la unión entre los carbonos 20 y 22 del colesterol, separando la cadena lateral de 6 carbonos (22 al 27) del colesterol, produciendo ácido isocapróico y pregnenolona. El sistema enzimático que media la transformación es complejo, incluyendo tres enzimas, el citocromo P450_{scc} propiamente dicho, una segunda proteína llamada adrenoxina y una flavoproteína (NADPH: reductasa de adrenoxina), además de fosfolípidos para crear la interacción entre el colesterol y las enzimas. El proceso consume NADPH+H y oxígeno molecular y ocurre sin la liberación de productos intermediarios, solo ácido isocapróico y pregnenolona (Díaz Chico, 2004).

4.6 SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES A NIVEL OVÁRICO

La señal principal para iniciar la síntesis de hormonas esteroides en las células esteroideogénicas del ovario es la unión de la LH a con sus receptores específicos en la membrana celular, lo que activa la síntesis intracelular de AMP-cíclico (Díaz Chico, 2004). Además la síntesis de hormonas esteroides por las gónadas depende de la disponibilidad de colesterol para su sucesiva conversión en pregnenolona, progesterona, andrógenos, y estrógenos (Belin et al, 2000).

En el folículo ovárico las células de la granulosa y de la teca del folículo son los sitios donde se producen las hormonas esteroides. La teca interna produce grandes cantidades de andrógenos (androstenediona y testosterona), los cuales se difunden hacia las células de la granulosa, donde sirven como sustrato para la producción de estrógenos (Mindnich et al., 2004; Sanderson, 2006). Por otro lado, las células de la granulosa producen progesterona (Belin et al., 2000) pero son incapaces de convertirla en andrógenos, por lo que es necesaria la interacción de ambos tipos celulares a nivel ovárico.

4.6.1 PRODUCCION DE PROGESTERONA LÚTEA

La producción de progesterona a nivel ovárico se lleva acabo principalmente por las células lúteas bajo el efecto de la LH (Sirois et al., 1991; Donadeu y Ginther, 2001). Se ha encontrado una asociación positiva entre los niveles de la proteína StAR y la producción de progesterona, lo que habla de la importancia de esta proteína como paso limitante en la producción de progesterona (Kerban et al., 1999).

La biosíntesis de progesterona requiere de solo dos reacciones enzimáticas; la conversión de colesterol a pregnenolona y la transformación de pregnenolona a progesterona. Como ya se mencionó, el primer paso requiere la intervención de la proteína StAR, que es la responsable de transferir el colesterol de la membrana mitocondrial externa a la interna (Belin et al., 2000), para que una vez dentro de la membrana mitocondrial interna el colesterol pueda ser atacado

por la P450_{scc} y convertido en pregnenolona (Stocco, 2000b). La segunda transformación requiere que sobre la molécula de pregnenolona recién formada actúe la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ^5 , Δ^4 isomerasa (3 β -HSD) presente en el retículo endoplásmico liso (SER), que la convertirá en progesterona (Stocco, 2000a; Christenson y Devoto, 2003). La 3 β -HSD tiene dos acciones sobre la molécula de pregnenolona, primero se produce la oxidación del grupo hidroxilo en el carbono 3 de la pregnenolona y en segundo lugar, como consecuencia de la oxidación se produce la isomerización del doble enlace, que cambia de posición. La oxidación requiere de la participación de NADPH+H (Díaz Chico, 2004).

La otra enzima que puede actuar sobre la pregnenolona es la 17 α -hidroxilasa (P450c17) que la convertirá en 17 α -hidroxi-pregnenolona. Normalmente en el cuerpo lúteo la 3 β -HSD es más activa que la P450c17, por lo que la gran mayoría de la pregnenolona se transforma en progesterona (Díaz Chico, 2004).

La diferenciación de las células de la granulosa del folículo en células lúteas capaces de producir progesterona en grandes cantidades se acompaña por un aumento en la expresión de las enzimas necesarias para la conversión de colesterol a progesterona (P-450_{scc} y 3 β -HSD), y en la disminución en la expresión de las enzimas que convierten la progesterona en estrógenos, por ejemplo la P-450c17 y la P-450 aromatasa (Sanderson, 2006).

Además del cuerpo lúteo primario, en la yegua los cuerpos lúteos accesorios también producen cantidades considerables de progesterona, hecho demostrado por las altas concentraciones de progesterona encontradas en la vena proveniente de ovarios que contenían exclusivamente un cuerpo lúteo secundario (Squires y Ginther, 1975b), por lo que se considera que el cuerpo lúteo secundario sirve como suplemento y no reemplaza la fuente primaria de progesterona producida por el primer cuerpo lúteo (cuerpo lúteo primario de la gestación).

4.6.2. SECRECIÓN DE PROGESTERONA DURANTE LOS PRIMEROS MESES DE LA GESTACIÓN EQUINA

Para mantener la gestación se requiere mantener altos niveles de progesterona de manera continúa (Squires et al., 1974b). La secreción de progesterona aumenta de manera muy rápida entre el día 0 (ovulación) y el día 1 (Gastal et al., 2005), continuando en aumento hasta el día 8 post-ovulación, a partir del cual se estabilizan para comenzar a bajar alrededor del día 13 o 14 en yeguas no gestantes debido a la regresión del cuerpo lúteo (Bergfelt et al., 1989) En la yegua gestante no se produce la regresión del cuerpo lúteo a partir del día 13, aunque los niveles de progesterona si sufren una disminución entre los días 12 y 30, para posteriormente aumentar entre los días 32 a 44 debido a la estimulación lútea ejercida por la eCG (Squires et al., 1974b). Se ha encontrado una relación positiva durante los primeros meses de gestación equina, entre la secreción de eCG y la producción de progesterona lútea, pues una vez iniciada la secreción de eCG (después del día 35) se estimula un incremento en la producción de progesterona (Daels et al., 1998).

Durante la gestación de la yegua los niveles de progesterona aumentan progresivamente entre el día cero y el día 8 (Holtan et al., 1975), cuando llegan a ser de 7 o más ng.ml^{-1} , disminuyendo a partir de día 14 (Squires et al., 1974b) para llegar a menos de 5 ng.ml^{-1} en el día 28. Durante el primer mes de la gestación la producción de progesterona por el cuerpo lúteo es mantenida por la secreción de LH hipofisiaria, por lo que existe una correlación positiva entre las concentraciones de LH y las de progesterona entre los días 5 y 24 de la gestación (Nett y Pickett, 1979; Belin et al., 2000). También se ha demostrado la relación temporal entre los pulsos de LH y los pulsos de progesterona (Perkins et al., 1993).

Entre los días 28 y 44 las concentraciones de progesterona vuelven a elevarse debido al inicio de la secreción de eCG (Nett y Pickett, 1979; Daels et al., 1991) que estimula al tejido lúteo del ovario para que secrete una mayor cantidad

de progesterona (Squires et al., 1974b). Las concentraciones de progesterona alcanzan su máximo nivel alrededor del día 65 de la gestación, cuando superan los 15 ng.ml^{-1} (Holtan et al., 1975). Posteriormente disminuyen gradualmente hasta alcanzar niveles muy bajos entre los días 150 y 180 (Squires et al., 1974b). En esta etapa los cuerpos lúteos han dejado de producir progesterona, pero el apoyo progestacional de la gestación se mantiene porque la placenta adquiere la capacidad de producir cantidades suficientes de progesterona a partir del día 120 de la gestación (Holtan et al., 1979).

La eCG producida por las copas endometriales de la yegua tiene un importante papel luteotrópico entre el día 35 y el día 120 a 150 de la gestación equina. El incremento en las concentraciones de progesterona que ocurre a partir de que se inicia la secreción de eCG (día 35) se atribuye tanto al resurgimiento del cuerpo lúteo primario (Daels et al., 1991b) como a la formación y desarrollo de cuerpos lúteos secundarios (Bergfelt et al., 1989). En un estudio se observó que en todas las yeguas ocurre un incremento en las concentraciones de progesterona entre los días 32 y 44 de la gestación a pesar de que aún no han ocurrido ovulaciones secundarias, lo que demuestra que el cuerpo lúteo primario aumenta su actividad al ser expuesto a la eCG (Squires et al., 1974c).

La relación entre la elevación de las concentraciones de progesterona y el inicio de la producción de eCG es muy clara. El incremento en las concentraciones de progesterona no ocurre antes de que se inicie la secreción de eCG, pero se elevan de inmediato desde el primer día en que se logra detectar la presencia de eCG en la circulación (Bergfelt et al., 1989), alcanzando niveles significativamente superiores dos días después de la detección de eCG (Bergfelt et al., 1989). Una relación similar entre las concentraciones de progesterona y la primera detección de gonadotropinas coriónicas ha sido encontrada en monos (Knobil, 1973) y humanos (LeMaire et al., 1971). Por otra parte, las concentraciones de progesterona se incrementan después de día 35 en yeguas gestantes, pero no en yeguas donde se realiza la histerectomía en las que el cuerpo lúteo de la ovulación se mantiene mas allá del día 35, pero no se reactiva (Squires et al.,

1974a) indicando que los cuerpos lúteos no están programados intrínsecamente para resurgir a partir del día 35, sino que se requiere la eCG de origen fetal para que se dé el incremento de progesterona.

El papel luteotrópico de la eCG también se ha demostrado in vitro, donde se ha encontrado que estimula la producción de progesterona por las células de la granulosa en una manera proporcional a la dosis aplicada (Knobil y Neil, 1998). La adición de eCG a un medio conteniendo cortes de cuerpos lúteos primarios o secundarios obtenidos de yeguas en el día 100 de la gestación resultó en un incremento significativo en la producción de progesterona in vitro (Squires et al., 1979).

Los niveles de eCG durante la gestación equina son enormes ($1-8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) comparados con los niveles de LH ($5-30 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), por lo que logra una buena ocupación de los receptores de LH a pesar de su baja afinidad por los mismos (Knobil y Neil, 1998). Tanto el cuerpo lúteo primario de la gestación como los secundarios responden a la eCG durante todo el tiempo que se mantiene su secreción por las copas endometriales (Saint-Dizier et al., 2003).

En el caso de las yeguas servidas con burro, la destrucción prematura de las copas endometriales provoca una caída muy rápida en las concentraciones de eCG, lo que tiene como consecuencia una producción de progesterona significativamente menor a la de las yeguas gestantes con caballo desde el segundo mes de la gestación (Allen y Stewart, 1993; Allen et al., 1993b; Boeta y Zarco, 2005), lo que podría ser la causa de un cierto número de pérdidas de la gestación en las yeguas utilizadas para la producción de mulas debido a que la placenta aún no tiene la capacidad de producir suficiente progesterona para mantener al gestación al producirse la regresión prematura de las copas endometriales y de los cuerpos lúteos.

4.6.3 PRODUCCIÓN DE ANDRÓGENOS OVÁRICOS

En todas las especies el ovario debe producir andrógenos para poder producir estrógenos ya que estos se producen a partir de la aromatización de andrógenos. Sin embargo, en la yegua la producción de andrógenos es muy elevada, por lo que una proporción muy importante de los andrógenos producidos pasan a la circulación sin ser convertidos en estrógenos, siendo los andrógenos más importantes en la circulación de la yegua la androstenediona y la testosterona.

4.6.4 PRODUCCIÓN DE ANDROSTENEDIONA

Tanto la pregnenolona como la progesterona son sustratos de la enzima 17α -hidroxilasa, enzima del retículo endoplásmico que cataliza el paso limitante en la formación de andrógenos. Esta enzima está compuesta por un citocromo específico, P450_{17C} y por la flavoproteína NADPH-citocromo P450 reductasa. (Díaz Chico, 2004).

En caso de que el sustrato sea la pregnenolona, la enzima 17α -hidroxilasa produce, 17α -hidroxipregnenolona, sobre la que después actuará otra vez la hidroxilasa como la 17-20 liasa que corta la unión entre el carbón 17 y el 20, dando como resultado la formación de dehidroepiandrosterona, que ya es un andrógeno de 19 carbonos. Posteriormente actuará la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa para transformarla en androstenediona (Díaz Chico et al., 2004). Por otra parte, si el sustrato de la 17α -hidroxilasa es la progesterona, la enzima producirá en primera instancia 17α -hidroxiprogestero, que será atacada nuevamente por la actividad 17-20 liasa de la 17α -hidroxilasa para formar androstenediona (Díaz Chico et al., 2004).

Interesantemente se ha encontrado una relación entre el inicio de la secreción de eCG en la yegua gestante y un aumento en la producción lútea de andrógenos, asociado esto con un aumento en la expresión lútea de la enzima P450 17α -hidroxilasa después del inicio en la secreción de eCG (Albrecht y Daels,

1997). El aumento en la expresión de la 17 α -hidroxilasa en el cuerpo lúteo de la yegua que se produce a partir del día 40 de la gestación equina (Rodger et al., 1998) está muy correlacionado con el inicio en la secreción de eCG (Albrecht et al., 1997b).

4.6.5 SECRECIÓN DE ANDROSTENEDIONA DURANTE LA GESTACIÓN EQUINA TEMPRANA

La secreción de androstenediona durante los primeros meses de la gestación equina esta aparentemente influida por la eCG, pues antes del día 35 los niveles de androstenediona son bajos, para comenzar a elevarse a partir del día 35, aumentando de valores menores a 100 pg.ml⁻¹ en el día 35 a valores que de hasta 600 pg.ml⁻¹ en el día 45 en algunas yeguas. Debido a la correlación temporal se piensa que este aumento es debido al estímulo ejercido a nivel lúteo por la eCG (Daels et al., 1998). En yeguas que tenían un cuerpo lúteo funcional a las cuales se les administró eCG durante los días 22 a 28 (antes del inicio de secreción natural de eCG) se produjo un aumento en la secreción de androstenediona, mientras que en las yeguas que no recibieron eCG exógena no se produjo este aumento antes del día 35 (Daels et al., 1998), lo que confirma la capacidad de la eCG para estimular la producción de androstenediona por el cuerpo lúteo (Daels et al., 1998). Esto podría explicar el porqué la máxima secreción de eCG durante los días 60 a 70 de la gestación coincide con el pico de producción de androstenediona. Además al bajar las concentraciones de eCG circulante también lo hacen los niveles de androstenediona, aunque sufren un segundo incremento después del día 80, aparentemente debido a la activación de las gónadas fetales, las cuales expresan el gen responsable de codificar la enzima 17 α -hidroxilasa responsable de la síntesis de andrógenos (Hasewaga et al., 2001).

En el presente trabajo se propone una forma de evaluar el papel de la eCG en la síntesis de androstenediona durante la gestación equina mediante la comparación de las concentraciones de esta hormona durante la gestación normal

de yeguas servidas con caballo y la gestación de yeguas servidas con burro, en las que se sabe que existe una deficiencia natural en la producción de eCG (Boeta y Zarco, 2005).

4.6.6 BIOSÍNTESIS DE TESTOSTERONA

La producción de testosterona es resultado de la acción ejercida por la enzima 17β hidroxisteroide deshidrogenasa (17β HSD) sobre la molécula de androstenediona, transformándola en testosterona (Belin et al., 2000). La producción de andrógenos en las yeguas ocurre mayoritariamente en las células de la teca bajo el estímulo de LH (Sirois et al., 1991; Belin et al., 2000; Donadeu y Ginther, 2002).

La biosíntesis de testosterona a nivel ovárico es normalmente estimulada por la LH hipofisiaria, por lo que la eCG también puede potencialmente estimular la secreción de testosterona por las células ováricas.

La unión de la LH o eCG a los receptores para LH resulta en la activación de la proteína G que a su vez estimula a la enzima adenil ciclasa para provocar la elevación intracelular de los niveles de AMPc. Esto da como resultado la activación de la cascada de eventos que en última instancia ocasionan la síntesis y secreción de testosterona por las células de la teca del folículo ovárico en cuestión de minutos después de la estimulación inicial. La conversión del colesterol en testosterona ocurre mediante la activación de una serie de proteínas cuyas características y actividades enzimáticas son bien conocidas.

Las cuatro enzimas involucradas en la biosíntesis de testosterona son:

- a)- $P450_{sc}$ o citocromo P450 de ruptura de la cadena lateral
- b)- La 3β -Hidroxisteroide deshidrogenasa o 3β -HSD/ $\Delta^5 \Delta^4$ isomerasa
- c)- La $P450_{17\alpha}$
- d)- La 17β -Hidroxisteroide deshidrogenasa o 17β -HSD

El papel de cada enzima se describe a continuación;

A. P450_{scc}

La citocromo P450 de ruptura de la cadena lateral es parte de un sistema enzimático cuya función es cortar la cadena lateral del colesterol para producir pregnenolona. Durante la conversión de colesterol a pregnenolona ocurren tres eventos por separado. Primero, el colesterol es hidroxilado en la posición C22, seguido por una segunda hidroxilación en la posición C20 y finalmente se da la ruptura de la unión 20-22 para producir pregnenolona.

B. La 3 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa

La enzima 3 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD)/ Δ^5 Δ^4 isomerasa es la enzima responsable de la conversión de pregnenolona a progesterona en tejidos que utilizan la vía Δ^4 ene y la vía Δ^5 para la conversión de pregnenolona a hidroxipregnenolona. Esta enzima también puede efectuar la conversión de dehidroepiandrosterona a androstenediona. La actividad isomerasa rearrregla o acomoda el doble enlace encontrado entre el C5 y C6 para formar el doble enlace encontrado entre C4 y C5.

C. P450_{17 α}

Esta enzima, de la misma manera que la 3 β -HSD, también lleva a cabo dos funciones separadas. La primera de estas funciones es la hidroxilación del sustrato, ya sea pregnenolona o progesterona, a 17 α - hidroxipregnenolona o 17 α - hidroxiprogesteroa respectivamente. La segunda actividad mostrada por esta proteína es la actividad de 17,20 liasa con lo cual puede convertir los esteroides de 21 carbonos hidroxipregnenolona e hidroxiprogesteroa en los de 19 carbonos dehidroepiandrosterona y androstenediona respectivamente.

D. 17 β -HSD

La última reacción en la ruta de la biosíntesis de testosterona es la reducción de androstenediona a testosterona por la enzima 17 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa, que reside en el retículo endoplásmico. Esta enzima tiene actividad cetoesteroide reductasa. Esta es una reacción reversible en la cual la concentración de los substratos y los productos determinan la dirección de las reacciones químicas.

4.6.7 SECRECIÓN DE TESTOSTERONA DURANTE LOS PRIMEROS MESES DE GESTACIÓN EN LA YEGUA

Aunque los niveles de testosterona secretados por la yegua durante los primeros 4 meses de gestación son bajos comparados con los de la progesterona, la secreción de testosterona, al igual que la de otros andrógenos y estrógenos, sigue un patrón que coincide con la síntesis y secreción de la eCG (Rodger et al., 1998). Al parecer la secreción de testosterona durante la gestación de la yegua es bifásica (Silberzahn et al., 1984).

Daels et al. (1996) realizaron un estudio en yeguas gestantes diseñado para evaluar el papel de la eCG y del cuerpo lúteo en la producción de testosterona. Un grupo consistió de yeguas gestantes a las que simplemente se les determinaron las concentraciones de testosterona en diferentes etapas de la gestación. Un segundo grupo fue tratado con PGF 2α para destruir el cuerpo lúteo y también con altrenogest para mantener la gestación. Un tercer grupo fue tratado solamente con altrenogest, encontrando los siguientes resultados: En las yeguas a las cuales se les destruyó el cuerpo lúteo los niveles de testosterona fueron menores que los de los otros dos grupos desde antes de que se iniciara la secreción de eCG. Al elevarse las concentraciones de eCG, los niveles de testosterona se incrementaron rápidamente en las yeguas de los dos grupos que tenían cuerpo lúteo funcional. En el grupo que no tenía cuerpo lúteo funcional no se presentó el incremento asociado con el inicio de la secreción de eCG. Sin embargo, este

grupo tuvo un incremento gradual después del día 50, probablemente asociado con la luteinización de nuevos folículos por efecto de la eCG. Los niveles mas bajos de testosterona en yeguas sin cuerpo lúteo funcional antes de la secreción de eCG y la estrecha relación entre la secreción de eCG y el incremento de la secreción de testosterona en yeguas gestantes con un cuerpo lúteo funcional, pero no en aquellas sin cuerpo lúteo permiten proponer que el incremento en la secreción de testosterona después del día 35 de preñez es el resultado del estímulo de la eCG sobre la síntesis de testosterona lútea. En el presente estudio se prueba esta hipótesis mediante la comparación de los patrones de secreción de testosterona en yeguas servidas con caballo, que tienen producción normal de eCG, y en yeguas servidas con burro, que presentan niveles muy bajos de eCG durante la gestación.

4.6.8 PRODUCCIÓN DE ESTRÓGENOS A NIVEL OVÁRICO

En la producción folicular de estradiol están involucradas tanto las células de la teca como las células de la granulosa (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Bergfelt et al., 2001). El modelo común de dos células dos gonadotropinas para la producción de estradiol por los folículos preovulatorios sostiene que la teca interna es estimulada por la LH para producir andrógenos mientras que la FSH (y LH en folículos maduros) estimula a las células de la granulosa para que aromatice los andrógenos provenientes de la teca interna para convertirlos en estrógenos (Sirois et al., 1991). Otro modelo ha sugerido que el papel de las células de la granulosa es la de producir progesterona (Díaz Chico, 2004), mientras la teca interna es responsable de la producción de andrógenos (Boerboom et al., 1999) a partir de la progesterona producida por las células de la granulosa. Posteriormente los andrógenos regresarían a la célula de la granulosa para ser aromatizados a estrógenos.

Sirois et al. (1991) mostraron que las células de la granulosa sintetizan progesterona, la cual pasa a las células de la teca y es convertida en andrógenos.

Los andrógenos producidos por la teca interna pasan a las células de la granulosa, donde finalmente son aromatizados por la enzima aromatasa presente en estas células (YougLai y Jarrell, 1983) y son convertidos en estradiol (Schams y Berisha, 2002).

La enzima aromatasa, que es la responsable de catalizar la biosíntesis de estradiol es producto del gen CYP19 (Simpson y Davis, 2001, Hasewaga et al., 2001).

Conforme avanza la gestación las concentraciones de estradiol se elevan gradualmente, al parecer estimulados por la LH. En esta etapa se han encontrado aumentos en los niveles de la proteína StAR, la enzima P450_{scc} y la 3 β HSD (Belin et al., 2000), responsables de la producción de progesterona, así como un aumento en los niveles de la enzima aromatasa, responsable de la aromatización de los andrógenos (Belin et al., 2000). En cultivos de células de la granulosa a las que no se les suplió testosterona no se registró un aumento en la producción de estradiol en respuesta a las gonadotropinas, lo que indica la necesidad de cooperación con las células de la teca como proveedoras de andrógenos (Sirois et al., 1991).

La producción de eCG y su elevación a partir del día 35 coinciden con una estimulación de la síntesis de enzimas esteroidogénicas en el cuerpo lúteo de la yegua, incluyendo a la P450_{scc} y la 17 α -hidroxilasa (Albrecht y Daels, 1997; Albrecht et al., 1997a, 1997b). Algo interesante es que la actividad de la a enzima P450 aromatasa, que convierte los andrógenos en estrógenos, no es estimulada por la eCG, lo que sugiere que el paso limitante en la síntesis lútea de estrógenos es la disponibilidad de andrógenos, y no la capacidad de convertirlos en estrógenos. Al parecer la aromatasa está presente siempre en las células lúteas y no requiere de una activación por parte de la eCG, como ocurre con otras enzimas tales como la 17 α -hidroxilasa (Albrecht et al., 1997b).

4.6.9 PATRÓN DE SECRECIÓN DE ESTRÓGENOS DURANTE LA GESTACIÓN TEMPRANA EN LA YEGUA

Aunque los niveles de estradiol alcanzan su máximo nivel poco antes de la ovulación (Gastal et al., 2006), sufren una disminución conforme el cuerpo lúteo es formado (Belin et al., 2000), por lo que durante el diestro temprano disminuyen los niveles de aromataasa presentes en el ovario (Gastal et al., 2006). En esta etapa del ciclo estral existe una correlación negativa entre los niveles de LH y los de estradiol.

Entre los días 0 al 35 los niveles de estrógenos totales encontrados en las yeguas gestantes (0.5 ng.ml^{-1} o menos) son similares a los encontrados en una yegua vacía que se encuentre en la etapa de diestro (Terqui y Palmer, 1979). Después del día 35 se da un incremento en las concentraciones de estradiol que coincide con una elevación en los niveles plasmáticos de eCG (Urwin y Allen, 1982). Experimentalmente se ha demostrado que la administración exógena de eCG antes del día en el que normalmente comienza la secreción endógena de la hormona estimula la secreción de estrógenos en yeguas gestantes (Daels et al., 1998).

Los estrógenos que se secretan durante los dos primeros meses de la gestación en la yegua son de origen ovárico, ya que la elevación de sus niveles no ocurre si la yegua es ovariectomizada antes del día 35 y se le mantiene la gestación con progestágenos sintéticos (Terqui y Palmer, 1979; Daels et al., 1990). Los niveles de estrógenos conjugados en yeguas ovariectomizadas gestantes fueron aproximadamente un 13% con respecto a las concentraciones en yeguas intactas gestantes (grupo testigo) entre los días 20 a 33, de 5% en el día 39 y de 20% en el día 70 (Daels et al., 1990). La mayor parte de los estrógenos durante los primeros dos meses de la gestación son secretados por el tejido lúteo y no por los folículos (Daels et al., 1991b).

Los niveles de estrógenos totales se mantienen elevados a más de 3 ng.ml^{-1} entre los días 40 y 60, después de lo cual ocurre una segunda elevación para llegar a más de 10 ng.ml^{-1} para el día 90).

Después del día 90 conforme la gestación progresa en la especie equina, las gónadas fetales empiezan a crecer y aumentan la secreción de dehidroepiandrosterona en la circulación fetal, y esta pasa a la placenta donde sufre aromatización (Ainworth y Ryan, 1966; Raeside y Liptrap, 1975; Pashen y Allen, 1979; Raeside et al., 1979), lo que se refleja en un aumento en las cantidades de estradiol, por lo que el estradiol secretado después del día 90 es de origen fetal-placentario y no ovárico.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 Localización

El presente estudio se realizó en el Rancho San Francisco de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizado en Chalco, Estado de México, a 19° 09´ 20" latitud norte y 90° 58´ 17" longitud oeste a 2,550 metros sobre el nivel del mar (García, 1981).

5.2 Animales y grupos experimentales

Se utilizaron 20 yeguas criollas de 4 a 14 años de edad y con peso promedio de 270 kg. La condición corporal de las yeguas variaba entre 2.5 y 3.5 en una escala de 0 a 5 (Martin-Rosset, 1993) siendo esta condición la óptima para la especie equina.

Las yeguas permanecieron en estabulación y se alojaron en corrales grupales dotados de espacio y comederos suficientes, así como una fuente permanente de agua para bebida. La dieta consistió en heno de avena, heno de alfalfa y concentrado comercial.

Con la finalidad de contar con yeguas con niveles altos y bajos de eCG durante la gestación, los animales fueron divididos al azar en dos grupos: El grupo de alta eCG estuvo constituido por yeguas inseminadas con semen de caballo (n=10) y el grupo de baja eCG formado por yeguas inseminadas con semen de burro (n=10). 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 por vía oral (altrenogest .044mg/Kg). Una vez detectado el estro durante 3 días por medio de

un caballo recelador las yeguas fueron examinadas diariamente a través de palpación y ultrasonografía transrectal para determinar el grado de desarrollo folicular. Al detectarse un folículo de 38 mm o mayor se programaba para la inseminación artificial inyectando para ello 1,500 UI de hCG (Ginther, 1986) para inducir la ovulación y la inseminación se realizaba 24 horas después. El día en el cual se llevó a cabo la inseminación fue considerado de manera convencional como el día cero de la gestación.

Para la inseminación artificial se colectó, según el caso, semen de un burro Kentucky o de un garañón por medio de vagina artificial modelo Missouri y se diluyó el semen 3:1 en leche descremada ultra pasteurizada (Boeta y Zarco, 2000), conservándose a 5°C en un equitainer (Hamilton Thorn) hasta la inseminación artificial de las yeguas. Una vez inseminadas, las yeguas fueron inspeccionadas nuevamente por ultrasonografía utilizando un equipo Sonovet 600 con transductor lineal de 5 Mhz para confirmar la gestación doce días después de haberse inseminado (día 0 = día de inseminación). Toda aquella yegua diagnosticada como vacía volvía al proceso de detección de calores y se procedía a inseminar de nuevo para tratar de establecer una gestación. Una vez que las yeguas quedaban gestantes se conformaron los grupos de manera permanente.

A partir de los 30 días de gestación se realizaron ultrasonidos 2 veces a la semana para determinar la viabilidad embrionaria, el ritmo de crecimiento de la vesícula fetal, así como el diámetro de los cuerpos luteos. Se utilizó un equipo de ultrasonido con transductor lineal de 5 Mhz hasta el día 60 de la gestación, y posteriormente se utilizó un transductor lineal de 3.5Mhz (Aloka, Echo Camera SSD-506; Aloka, Co., LTD, Tokio, Japan) hasta los 150 días. En cada evaluación se determinó además la viabilidad fetal mediante la presencia de latido cardiaco, movimiento fetal y/o pulsación del cordón umbilical del producto.

Diagrama del experimento

Grupo Baja eCG (yeguas gestantes con embrión equino) n= 10

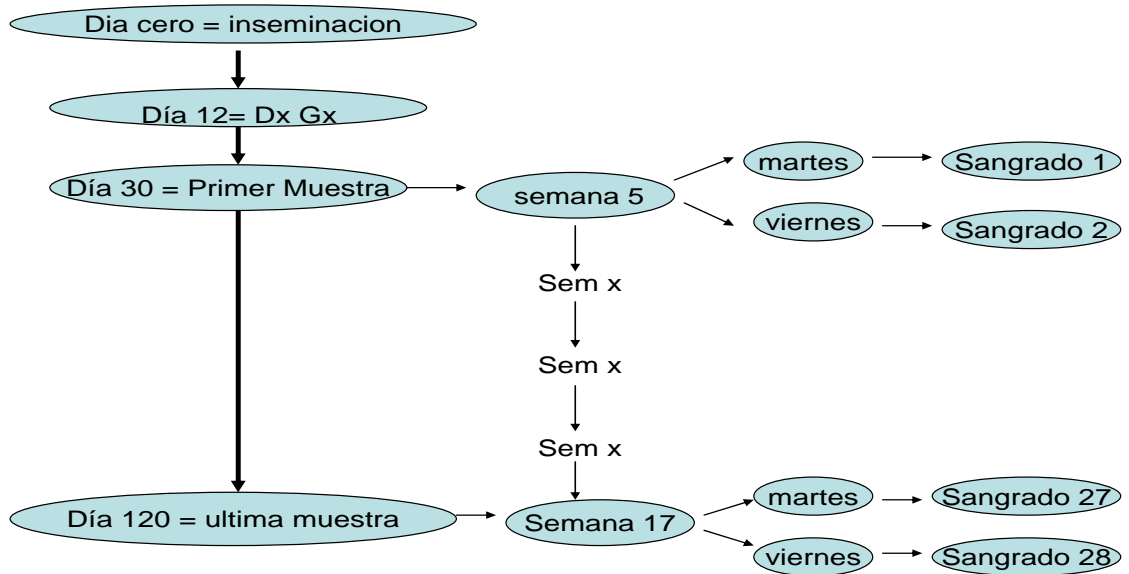


Diagrama del experimento

Grupo Baja eCG (yeguas gestantes con embrión mula) n= 10

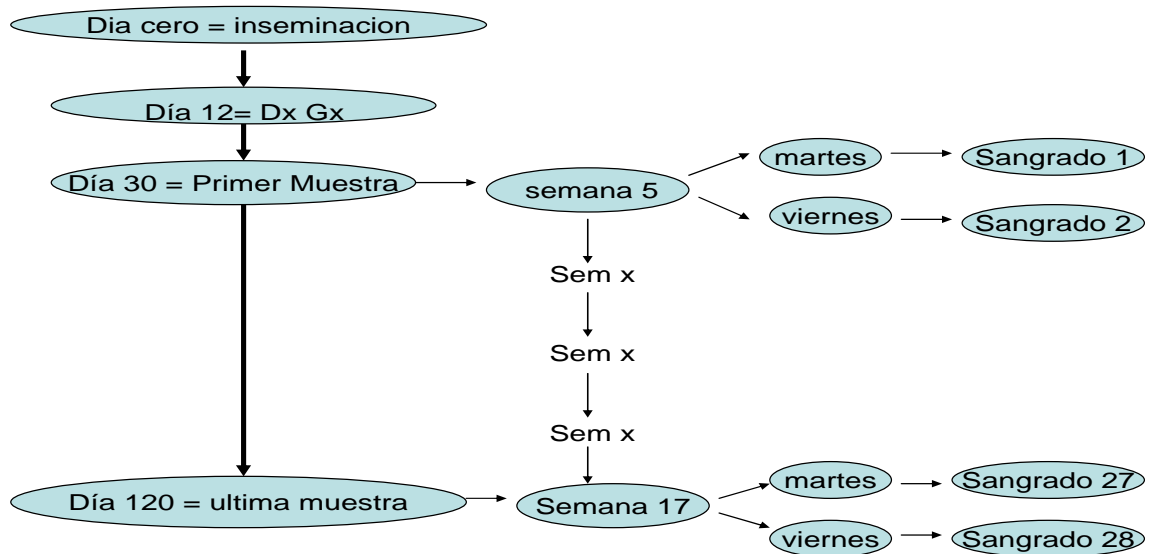


Fig. 1 Diagrama que muestra las actividades llevadas a cabo durante el trabajo de campo en ambos grupos de animales. Dx Gx = Diagnóstico de gestación, Sem x = enumera las semanas consecutivas que desde la semana 5 hasta la semana 17.

5.3 Muestreo sanguíneo y procesamiento de muestras

Se recolectaron muestras de sangre dos veces por semana mediante venopunción yugular utilizando tubos al vacío con gel activador de la coagulación para separar el paquete celular del plasma sanguíneo.

El plasma se separó del paquete celular mediante centrifugación a 3,000 rpm durante 10 minutos. El plasma se mantuvo congelado a -20°C , hasta el momento de realizar los análisis para las determinaciones hormonales en el Laboratorio de Endocrinología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Las concentraciones de eCG se determinaron mediante enzimo inmunoensayo (ELISA) en placas de micro titulación, basado en el principio de sándwich (PMSG ELISA EIA-1298, Paramedical ^{SRL}, Faiano, Italia; Munro et al., 1997; Shimizu et al., 2003). El ensayo tuvo una sensibilidad de $3\text{ UI}\cdot\text{ml}^{-1}$ y un coeficiente de variación intraensayo del 7.1% para los valores bajos, 11.6% para los valores altos y un coeficiente de variación interensayo del 10%.

La progesterona se midió por radioinmunoanálisis en fase sólida, empleando el kit Coat-A-Count® Progesterona (Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA., U.S.A) con una sensibilidad del ensayo de $0.1\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ y coeficiente de variación intra e interensayo del 4 y 7% respectivamente (Pulido et al., 1991).

La androstenediona fue medida de acuerdo a lo descrito por Daels et al. (1998) mediante radioinmunoensayo en fase sólida empleando para ello el kit Coat-A-Count® Androstenediona (Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA., U.S.A), con una sensibilidad de $40\text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ un coeficiente de variación intraensayo de 2.2% y un coeficiente de variación inter ensayo de 1.8%.

Los niveles de estradiol se midieron mediante enzimo inmuno ensayo, usando un antisuero policlonal (Estradiol, R4972), proveído por la Doctora Coralie Munro

(University of California-Davis, Davis, CA; Munro y Stabenfelt, 1984; Walter et al., 2002;). Se utilizó la placa polysorb a una temperatura de 30°C. El coeficiente de variación intraensayo fue de 5.5 - 9.5%.

Los niveles de testosterona se midieron mediante enzimo inmuno ensayo, usando un antisuero policlonal (Testosterona, R156/7), proveído por la Doctora C. Munro (University of California-Davis, Davis, CA; Munro y Stabenfelt, 1984; Walter et al., 2002). Se utilizó una placa polysorb incubándose durante 18 horas a una temperatura de 4°C. El coeficiente de variación intraensayo fue de 1.2 a 3.8.

5.4 Análisis estadístico

Se utilizó un análisis de varianza para mediciones repetidas, comparando curvas de andrógenos, estrógenos, progesterona y eCG entre grupos (yeguas inseminadas con caballo y yeguas inseminadas con burro). Dentro de cada grupo, se correlacionaron las concentraciones de eCG con las de cada una de las otras hormonas (andrógenos, estrógenos, progesterona).

6. RESULTADOS

En la figura 5.1 se muestran las concentraciones promedio de eCG entre la semana 5 y 17 de la gestación en las yeguas inseminadas con caballo (embrión equino) y las yeguas inseminadas con burro (embrión mula). Las concentraciones de la hormona siempre fueron mayores en las yeguas inseminadas con caballo que en las yeguas inseminadas con burro. Las diferencias entre ambos tipos de gestación fueron estadísticamente significativas entre la semana 7 y la semana 13 de la gestación ($p < 0.01$). Las concentraciones promedio de eCG en las yeguas con embrión equino alcanzaron un máximo de $392 \text{ UI}\cdot\text{ml}^{-1}$ en la semana 8 de la gestación, mientras que en las yeguas con embrión mula el máximo nivel fue de tan solo $48 \text{ UI}\cdot\text{ml}^{-1}$, el cual fue alcanzado en la semana 7. En las yeguas inseminadas con caballo las concentraciones de eCG regresaron a niveles basales en la semana 17, mientras que en las servidas con burro lo hicieron desde la semana 12.

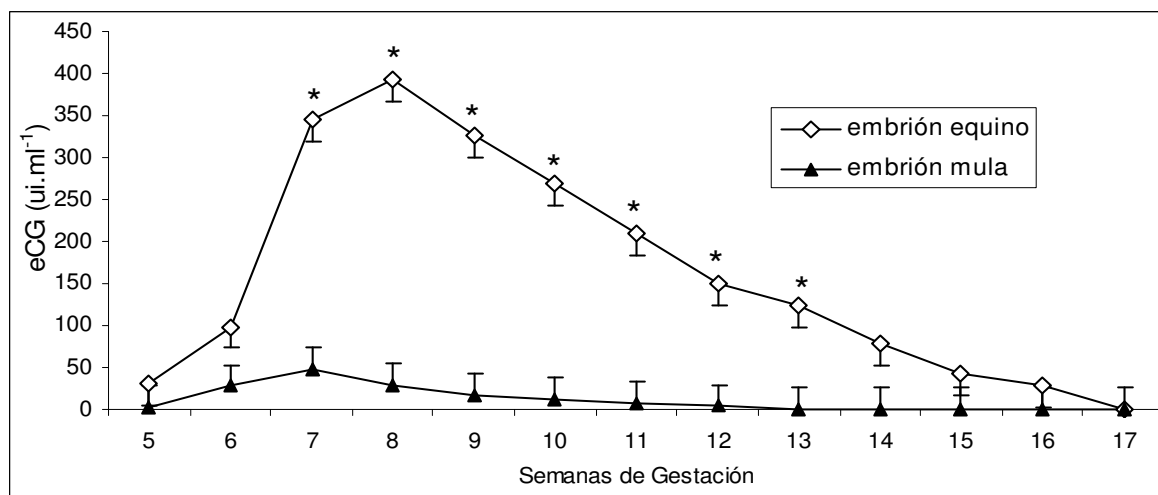


Figura 5.1. Concentraciones promedio de eCG entre la semana 5 y la semana 17 de la gestación en yeguas gestantes con embrión equino o con embrión mula. Las barras representan el error estándar. Los asteriscos indican las semanas en las que las concentraciones de eCG fueron diferentes entre los dos tipos de gestación ($p < 0.01$).

En la figura 5.2 se muestran las concentraciones promedio de progesterona entre la semana 5 y 17 de la gestación en las yeguas inseminadas con caballo (embrión equino) y las yeguas inseminadas con burro (embrión mula). Las concentraciones de la hormona siempre fueron mayores en las yeguas inseminadas con caballo que en las yeguas inseminadas con burro, siendo las diferencias entre los dos tipos de gestación estadísticamente significativas ($p < 0.05$) desde la semana 10 hasta la semana 17 de la gestación. En las yeguas con embrión equino las concentraciones de progesterona se elevaron entre la semana 5 y la semana 6, manteniéndose por encima de 12 ng.ml^{-1} a partir de la semana 6 hasta el término de los muestreos en la semana 17. En las yeguas con embrión mula las concentraciones de progesterona también se elevaron entre la semana 5 y la semana 6, a partir de ese momento se redujeron en forma gradual pero constante, llegando a menos de 10 ng.ml^{-1} en la semana 8 y a menos de 5 ng.ml^{-1} en la semana 13. Al momento del último muestreo (semana 17), las concentraciones de progesterona eran de tan solo 3.6 ng.ml^{-1} .

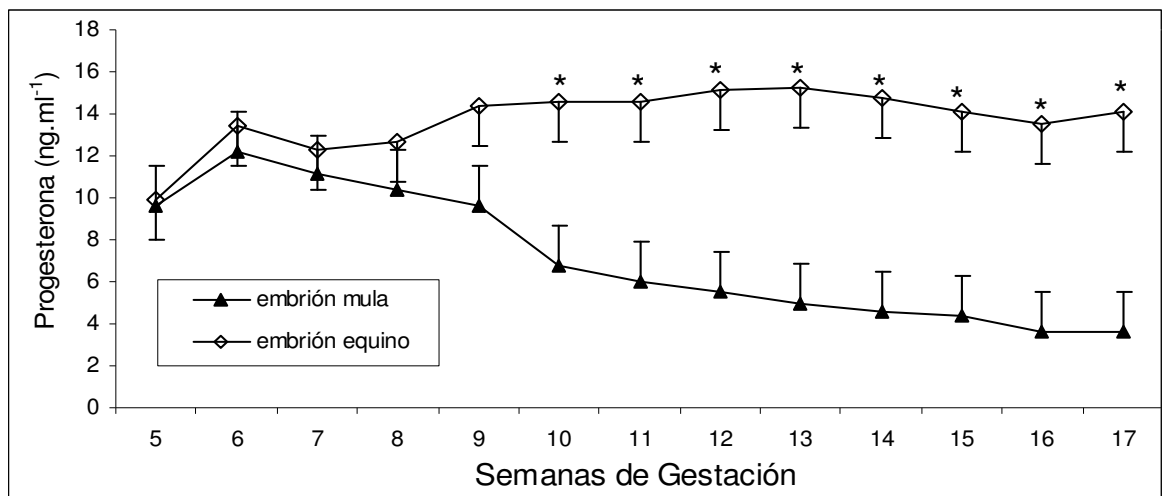


Figura 5.2. Concentraciones promedio de progesterona entre la semana 5 y la semana 17 de la gestación en yeguas gestantes con embrión equino o con embrión mula. Las barras representan el error estándar. Los asteriscos indican las semanas en las que las concentraciones de progesterona fueron diferentes entre los dos tipos de gestación ($p < 0.05$).

En la figura 5.3 se muestran las concentraciones promedio de androstenediona entre la semana 5 y 15 de la gestación en las yeguas inseminadas con caballo (embrión equino) y las yeguas inseminadas con burro (embrión mula). No se determinaron las concentraciones en las semanas 16 y 17. Las concentraciones de la hormona siempre fueron mayores en las yeguas servidas con caballo que en las yeguas inseminadas con burro. Las concentraciones promedio de androstenediona durante todo el periodo de muestreo fueron mayores ($p < 0.05$) en yeguas con embrión equino ($365 \pm 32 \text{ pg.ml}^{-1}$) que en las yeguas con embrión mula ($35 \pm 32 \text{ pg.ml}^{-1}$). La amplia variabilidad entre individuos no permitió identificar diferencias en semanas específicas. El patrón temporal de las concentraciones promedio de androstenediona fue más variable que el de otras hormonas, ya que en ambos tipos de gestación se registraron varias elevaciones y disminuciones a lo largo del estudio.

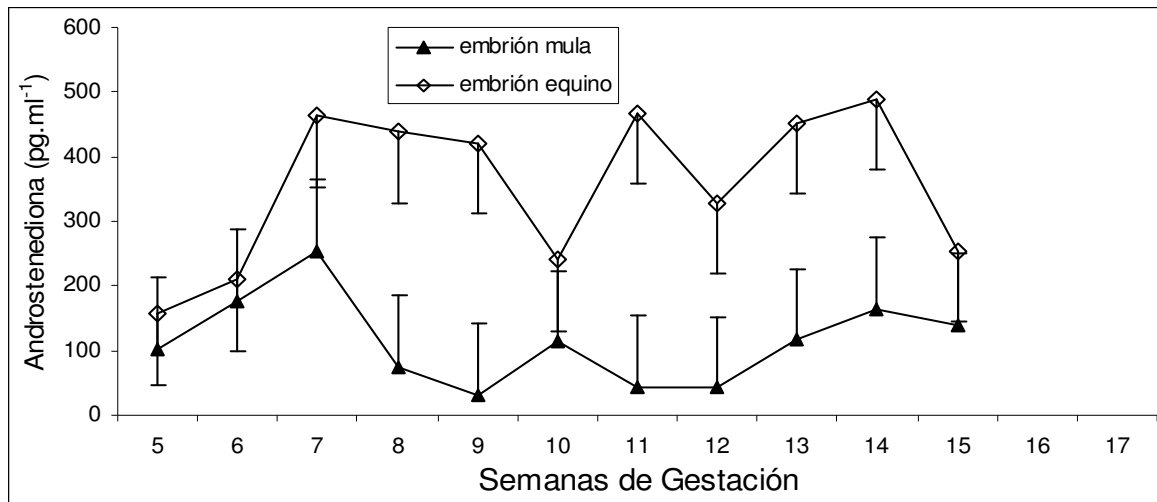


Figura 5.3. Concentraciones promedio de androstenediona entre la semana 5 y la semana 15 de la gestación en yeguas gestantes con embrión equino o con embrión mula. Las barras representan el error estándar. Las concentraciones promedio de androstenediona durante todo el periodo de muestreo son mayores en yeguas con embrión equino que en las yeguas con embrión mula ($P < 0.05$). Las diferencias en semanas específicas no son significativas ($P > 0.05$)

En la figura 5.4 se muestran las concentraciones promedio de testosterona entre la semana 5 y 17 de la gestación en las yeguas inseminadas con caballo (embrión equino) y las yeguas inseminadas con burro (embrión mula). Las concentraciones promedio de testosterona siempre fueron mayores en las yeguas con embrión equino que en las yeguas con embrión mula, siendo las diferencias entre ambos tipos de gestación significativas en las semanas 7, 9 y 10 ($P < 0.05$). En el caso de las yeguas inseminadas con caballo las concentraciones promedio de testosterona se elevaron en forma sostenida entre la semana 5 y en la semana 9, para posteriormente reducirse ligeramente y terminar con una elevación. En el caso de las yeguas inseminadas con burro las concentraciones se elevaron en forma constante desde la semana 5 hasta la semana 16, disminuyendo ligeramente en la semana 17.

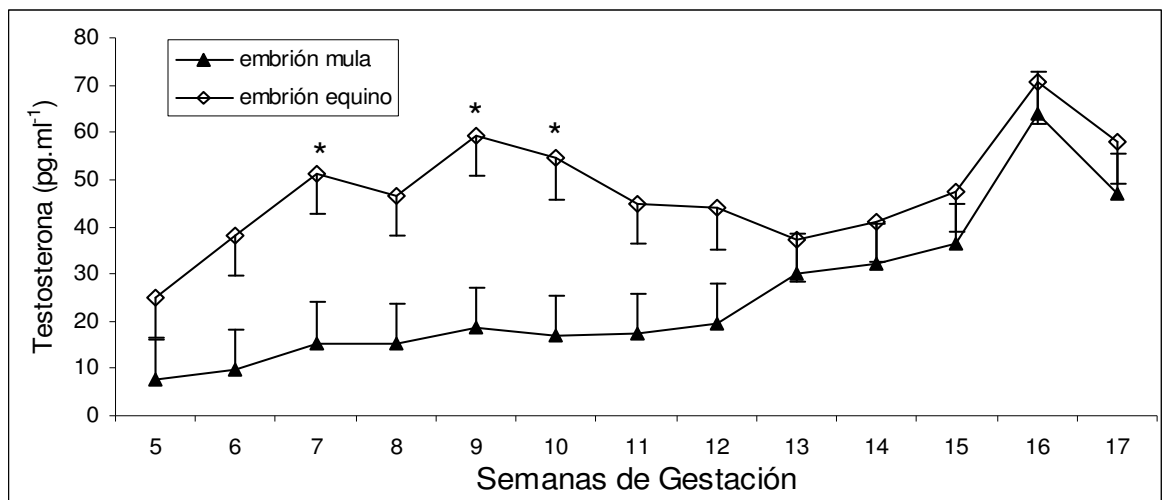


Figura 5.4. Concentraciones promedio de testosterona entre la semana 5 y la semana 17 de la gestación en yeguas gestantes con embrión equino o con embrión mula. Las barras representan el error estándar. Los asteriscos indican las semanas en las que las concentraciones de testosterona fueron diferentes entre los dos tipos de gestación ($p < 0.05$).

En la figura 5.5 se muestran las concentraciones promedio de estradiol entre la semana 5 y 17 de la gestación en las yeguas inseminadas con caballo (embrión equino) y las yeguas inseminadas con burro (embrión mula). Las concentraciones promedio de estradiol se mantuvieron bajas en ambos tipos de gestación hasta la semana 12 de la gestación. A partir de la semana 13 comenzaron a elevarse, siendo dicha elevación mucho mas marcada en las yeguas con embrión equino, por lo que las concentraciones en este tipo de gestación fueron significativamente mas elevadas que en las yeguas con embrión mula en las semanas 16 y 17 de la gestación ($P < 0.05$).

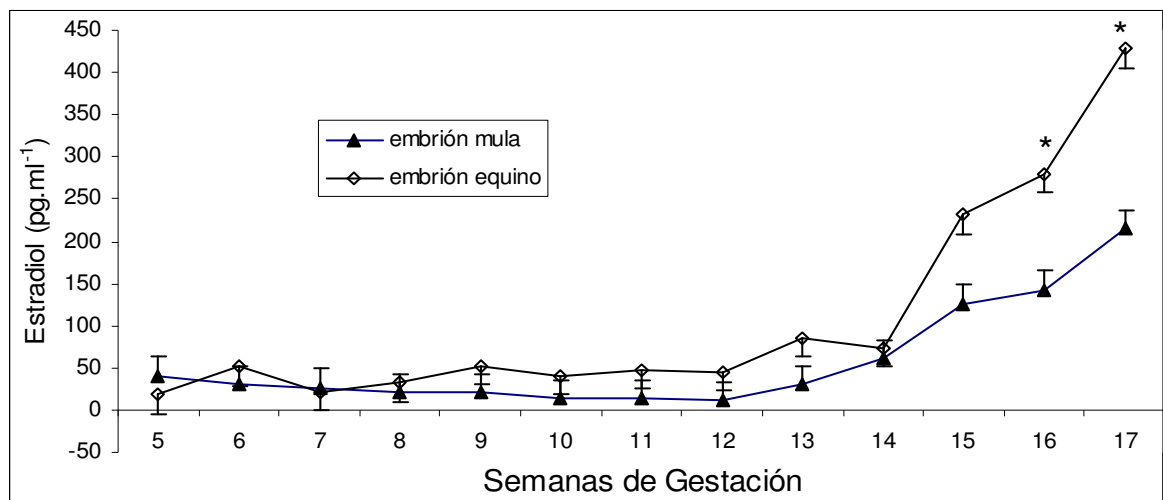


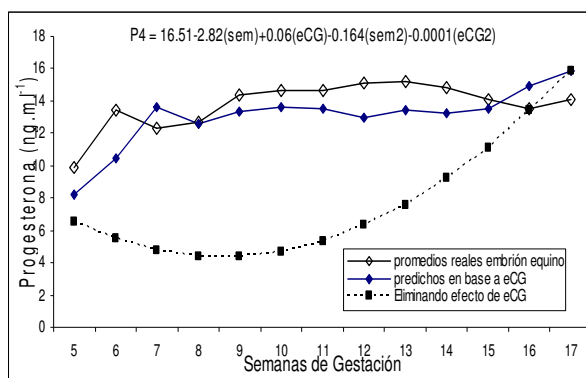
Figura 5.5. Concentraciones promedio de estradiol entre la semana 5 y la semana 17 de la gestación en yeguas gestantes con embrión equino o con embrión mula. Las barras representan el error estándar. Los asteriscos indican las semanas en las que las concentraciones de estradiol fueron diferentes entre los dos tipos de gestación ($p < 0.05$).

En la figura 5.6 se muestra el efecto de la concentración de eCG en la secreción de progesterona durante la gestación de yeguas gestantes con embrión equino grafica A y con embrión mula grafica B. En cada una de las figuras se muestran las concentraciones promedio reales de progesterona, las concentraciones de progesterona predichas de acuerdo a un modelo de regresión que considera los

efectos lineales y cuadráticos de la semana de gestación y los efectos lineales y cuadráticos de las concentraciones de eCG (en cada figura se presenta la ecuación). También se muestran las concentraciones que se obtendrían si de la ecuación se eliminan los efectos lineales y cuadráticos de la eCG.

Como se puede observar en el panel izquierdo de la figura 5.6, en el caso de las gestaciones con embrión equino la curva obtenida con la ecuación completa se ajusta mucho mejor a los promedios reales que la obtenida cuando se eliminan los efectos lineales y cuadráticos de la eCG, lo que indica que la eCG tienen grandes efectos en las concentraciones de progesterona presentes durante la gestación de yeguas inseminadas con caballo. En cambio, en el caso de las gestaciones con embrión mula el ajuste de la curva predicha a la real mejora en forma muy ligera con la ecuación completa y solamente durante las semanas 6 a 9 de la gestación, lo que indica que la secreción de progesterona en este tipo de gestación es en buena medida independiente de las pequeñas cantidades de eCG presentes durante la gestación mular, excepto durante el breve periodo de secreción de eCG en las gestaciones de yeguas inseminadas con burro.

Grafica A



Grafica B

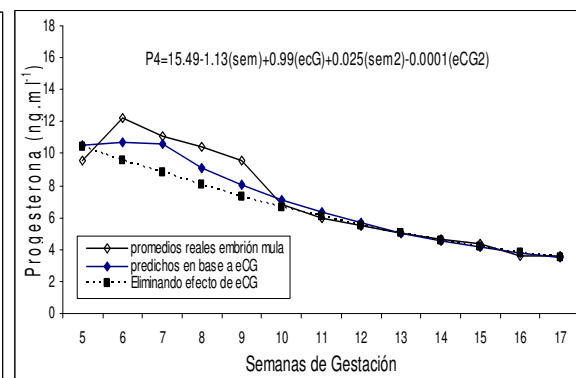


Figura 5.6 Efecto de las concentraciones de eCG en la secreción de progesterona en yeguas gestantes con embrión equino grafica A o con embrión mula grafica B. En cada caso se muestran las medias mínimo cuadráticas reales de las concentraciones de progesterona, las concentraciones de progesterona (P4) predichas mediante una ecuación de regresión lineal que considera los efectos lineales y cuadráticos de la semana de gestación (sem y sem2 respectivamente) y los efectos lineales y cuadráticos de las concentraciones de eCG (eCG y eCG2 respectivamente).

En la figura 5.7 se muestra el efecto de la concentración de eCG en la secreción de androstenediona durante la gestación de yeguas gestantes con embrión equino grafica A o con embrión mula grafica B. En cada gráfica se muestran las concentraciones promedio reales de androstenediona, las concentraciones de androstenediona predichas de acuerdo a un modelo de regresión que considera los efectos lineales y cuadráticos de la semana de gestación y los efectos lineales y cuadráticos de las concentraciones de eCG (en cada figura se presenta la ecuación). También se muestran las concentraciones que se obtendrían al eliminar de la ecuación los efectos lineales y cuadráticos de la eCG.

Como se puede observar en el panel izquierdo de la figura 5.7, en las gestaciones con embrión equino, la curva obtenida con la ecuación completa se ajusta mucho mejor a los promedios reales de androstenediona que la obtenida cuando se eliminan los efectos lineales y cuadráticos de la eCG, sugiriendo que la eCG tiene grandes efectos sobre las concentraciones de androstenediona presentes durante la gestación de yeguas inseminadas con caballo. En cambio, en las gestaciones con embrión mula el ajuste entre la curva predicha y la real mejora con la ecuación completa solamente en las semanas 6, 7 y 10, lo que indica que la secreción de androstenediona solamente es estimulada por la eCG durante el breve periodo en que esta hormona se eleva en gestaciones mulares.

Grafico A

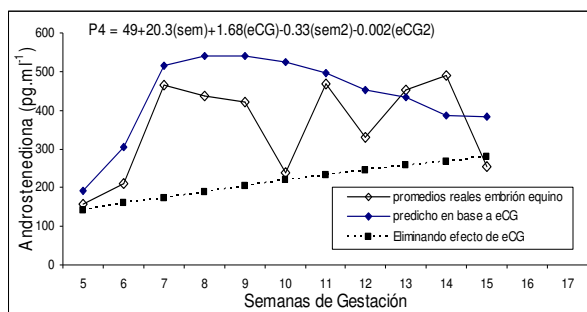


Grafico B

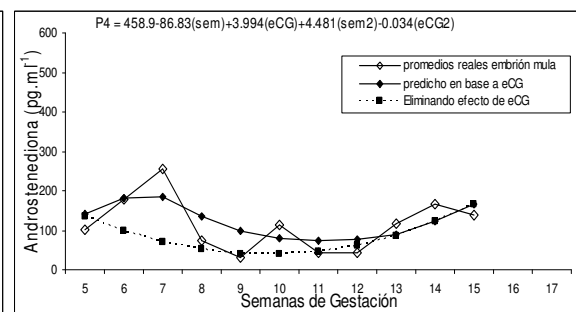
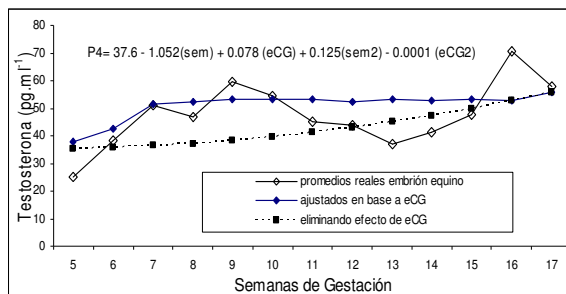


Figura 5.7 Efecto de las concentraciones de eCG en la secreción de androstenediona en yeguas gestantes con embrión equino grafica A o con embrión mula grafica B. En cada caso se muestran las medias mínimo cuadráticas reales de las concentraciones de androstenediona, las concentraciones de androstenediona (P4) predichas mediante una ecuación de regresión lineal que considera los efectos lineales y cuadráticos de la semana de gestación (sem y sem2 respectivamente) y los efectos lineales y cuadráticos de las concentraciones de eCG (eCG y eCG2 respectivamente).

En la figura 5.8 se muestra el efecto de la concentración de eCG en la secreción de testosterona durante la gestación de yeguas gestantes con embrión equino grafica A o con embrión mula grafica B. En cada gráfica se muestran las concentraciones promedio reales de testosterona, las concentraciones de testosterona predichas de acuerdo a un modelo de regresión que considera los efectos lineales y cuadráticos de la semana de gestación y los efectos lineales y cuadráticos de las concentraciones de eCG (en cada figura se presenta la ecuación). También se muestran las concentraciones que se obtendrían si de la ecuación se eliminan los efectos lineales y cuadráticos de la eCG.

Como se puede observar en el panel izquierdo de la figura 5.8, en las gestaciones con embrión equino, durante las semanas 6 a 10, pero no posteriormente, la curva obtenida con la ecuación completa se ajusta mejor a los promedios reales de testosterona que la obtenida cuando se eliminan los efectos lineales y cuadráticos de la eCG, sugiriendo que la eCG solo tiene efectos en las concentraciones de testosterona durante el periodo de máxima secreción de eCG. En cambio, en las gestaciones con embrión mula el ajuste entre la curva predicha y la real es similar cuando se incluyen o excluyen los efectos lineales y cuadráticos de la eCG, lo que sugiere que las bajas concentraciones de eCG en las gestaciones mulares son insuficientes para afectar la producción de testosterona.

Grafica A



Grafica B

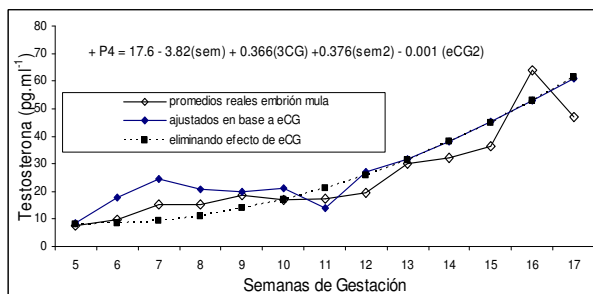


Figura 5.8 Efecto de las concentraciones de eCG en la secreción de testosterona en yeguas gestantes con embrión equino grafica A o con embrión mula grafica B. En cada caso se muestran las medias mínimo cuadráticas reales de las concentraciones de testosterona, las concentraciones de testosterona (P4) predichas mediante una ecuación de regresión lineal que considera los efectos lineales y cuadráticos de la semana de gestación (sem y sem² respectivamente) y los efectos lineales y cuadráticos de las concentraciones de eCG (eCG y eCG² respectivamente).

En la figura 5.9 se muestra el efecto de la concentración de eCG en la secreción de estradiol durante la gestación de yeguas gestantes con embrión equino grafica A o con embrión mula grafica B. En cada gráfica se muestran las concentraciones promedio reales de estradiol, las concentraciones de estradiol predichas de acuerdo a un modelo de regresión que considera los efectos lineales y cuadráticos de la semana de gestación y los efectos lineales y cuadráticos de las concentraciones de eCG (en cada figura se presenta la ecuación). También se muestran las concentraciones de estradiol que se obtendrían si de la ecuación se eliminan los efectos lineales y cuadráticos de la eCG.

Como se puede observar en las dos figuras, en ambos tipos de gestación los valores predichos se ajustan adecuadamente a los reales sin necesidad de incluir los efectos de las concentraciones de eCG, y el incluir dichos efectos no mejora el ajuste entre valores reales y valores predichos.

Grafica A

Grafica B

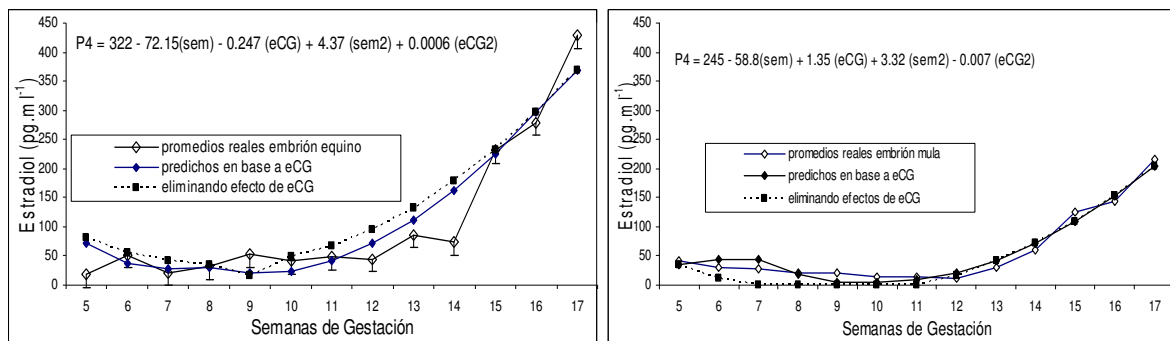


Figura 5.9 Efecto de las concentraciones de eCG sobre la secreción de estradiol en yeguas gestantes con embrión equino grafica A o con embrión mula grafica B. En cada caso se muestran las medias mínimo cuadráticas reales de las concentraciones de estradiol, las concentraciones de estradiol (P4) predichas mediante una ecuación de regresión lineal que considera los efectos lineales y cuadráticos de la semana de gestación (sem y sem2 respectivamente) y los efectos lineales y cuadráticos de las concentraciones de eCG (eCG y eCG2 respectivamente).

7. DISCUSION

Los resultados del presente trabajo (figura 5.1) confirman los informes previos que señalan que en las yeguas gestantes con embrión mula las concentraciones de eCG son mucho menores que las encontradas en yeguas gestantes con embrión equino (Boeta y Zarco, 2005). También se confirma que la pequeña elevación en las concentraciones de eCG en las yeguas inseminadas con burro es de naturaleza muy transitoria, regresando a niveles basales alrededor del día 70 de la gestación (Boeta y Zarco, 2005), lo que se debe al rechazo prematuro de las copas endometriales en las yeguas preñadas con embrión mula (Allen, 1982, Allen y Stewart, 1993; Allen et al., 1993b). Por otra parte, al analizar las concentraciones de progesterona (figura 5.2) se confirmaron los resultados de Boeta y Zarco (2005), quienes demostraron que las concentraciones de dicha hormona en las yeguas inseminadas con burro inician un descenso gradual pero continuo a partir de la semana 6 de la gestación, mientras que en las yeguas inseminadas con caballo las concentraciones de progesterona se mantienen estables hasta la semana 17, como resultado, las concentraciones de progesterona de las yeguas inseminadas con burro son significativamente menores que las de las yeguas inseminadas con caballo a partir del tercer mes de la gestación, lo que al parecer se debe a la falta de apoyo gonadotrópico (eCG) en las yeguas gestantes con embrión mula (Boeta y Zarco, 2005).

Diversos trabajos han demostrado que existe una fuerte correlación entre las concentraciones de eCG y las de progesterona entre el día 28 y el día 44 de la gestación, por lo que las concentraciones de progesterona se elevan súbitamente a partir del día 35, cuando comienza a producirse eCG (Squires et al., 1974b; Nett y Pickett, 1979; Daels et al., 1991, 1998). Sin embargo, en el presente trabajo se realizó por primera vez un intento de determinar cuantitativamente la importancia de la estimulación ejercida por la eCG en la producción lútea de progesterona durante un periodo más prolongado de la gestación equina. Para ello se realizaron análisis de regresión para determinar los efectos lineales y cuadráticos de la

semana de gestación y las concentraciones de eCG en las concentraciones de progesterona en cada tipo de gestación (embrión equino o embrión mula). Una vez calculada la ecuación de regresión, se eliminaron de la misma los efectos lineales y cuadráticos de la eCG y se evaluó el grado en el que dicha inhibición provocó un desajuste entre las concentraciones predichas de progesterona y la concentraciones promedio reales (observadas) en cada semana de gestación. Como puede observarse en la figura 5.6, el efecto de la eCG es de gran importancia en las yeguas inseminadas con equino, ya que la curva de valores predicho se apega mucho mejor a la de valores reales cuando en el modelo se incluyen los efectos de la eCG. Este concepto es apoyado además por el hecho de que la diferencia de ajuste entre ambas curvas es más marcada entre la semana 7 y la semana 12 de gestación, que corresponde precisamente al periodo de mayor producción de eCG (Figura 5.1). En este sentido, se ha demostrado que el cuerpo lúteo es capaz de responder a la eCG desde el inicio de la secreción de eCG (Saint-Dizier et al., 2003), pero que esta hormona continúa siendo capaz de estimular in vitro la producción de progesterona en cortes de cuerpos lúteos primarios y secundarios del día 100 de la gestación (Squires et al., 1979). También se ha demostrado que la eCG estimula la producción de progesterona en células de la granulosa en forma proporcional a la dosis de eCG aplicada (Knobil y Neil, 1998). Por otra parte, en la figura 5.6 también se observa que el efecto de la eCG es mucho menos marcado en las yeguas servidas con burro, en las que a partir de la semana 10 de la gestación las concentraciones reales son predichas con gran precisión tanto con la ecuación completa como al suprimir los efectos de la eCG. Sin embargo, aún en este tipo de gestación la producción de eCG tiene efectos en la producción de progesterona, ya que durante las semanas 6, 7 y 8 la inclusión de los efectos de la eCG si mejora el ajuste de la curva predicha a la curva real, correspondiendo este periodo precisamente al único momento en el que existe una ligera elevación de las concentraciones de eCG en las yeguas inseminadas con burro (figura 5.1). Esto sugiere que en este periodo temprano de la gestación las células lúteas son muy sensibles a la eCG, por lo que son capaces de

responder a concentraciones pequeñas de la hormona. Inclusive es posible sugerir que en la semana 6 el cuerpo lúteo puede ser tan sensible a la eCG que responde en forma máxima a concentraciones de eCG menores a los 30 U.I.ml⁻¹, ya que entre la semana 5 y 6, al comenzarse a producir eCG, la elevación en las concentraciones de progesterona fue similar en las yeguas inseminadas con caballo y en las inseminadas con burro (figura 5.2), a pesar de que en éstas últimas la elevación en las concentraciones de eCG fue mucho menor a la registrada en las yeguas inseminadas con caballo (figura 5.1). En este sentido, Bergfelt et al. (1989) demostraron que las concentraciones de progesterona aumentan significativamente durante los primeros dos días de secreción de eCG, cuando las concentraciones de esta última hormona aún no se han elevado hasta concentraciones muy elevadas.

El efecto estimulador de la eCG en la producción de progesterona lútea se debe a que la secuencia de aminoácidos de la eCG es idéntica a la LH equina (Smith et al., 1993; Bousfield et al., 1996), lo que permite que ambas hormonas se unan al receptor de LH en los tejidos equinos, por lo que inclusive se le ha denominado receptor de LH/CG (Stewart y Allen, 1979, 1981; Guillou y Combarous, 1983). En estudios hechos con eCG se ha observado que la afinidad de esta hormona por el receptor de LH/CG es diez veces menor que la afinidad de LH por el mismo receptor (Licht et al., 1979; Stewart y Allen, 1979, 1981; Guillou y Combarous, 1983; Saint-Dizier et al., 2003).

A pesar de esta baja afinidad por el receptor, la eCG es capaz de estimular la función lútea debido a que circula en concentraciones mucho más elevadas que las de la LH. Por ejemplo, Martinuk et al. (1990b) reportaron concentraciones séricas de eCG de 1-5 µg.ml⁻¹ en el día 39 de la gestación, mientras que los niveles de LH asociados a la oleada preovulatoria en el equino son de alrededor de 5 -130 ng.ml⁻¹ (Ginther, 1979), lo que muestra la enorme diferencia entre las concentraciones de eCG y las de LH. Así, los altos niveles de eCG en la yegua son suficientes para inducir la ovulación/luteinización en la yegua a pesar de tener menor afinidad por su receptor que la LH equina (Stewart y Allen, 1981).

Las altas concentraciones de eCG se deben en parte a una mayor cantidad de células secretoras de eCG en la copas endometriales que de células secretoras de LH en la hipófisis y en parte a la mayor vida media de la eCG en la circulación, la que a su vez se debe al alto contenido de ácido siálico en los oligosacáridos de la eCG (Legardinier et al., 2005a). En este aspecto debe recordarse que la eCG es la más glicosilada de las glicoproteínas pituitarias y placentarias de los mamíferos (Couture et al., 1993), con aproximadamente el 45% de su masa atribuible a sus carbohidratos (Papkoff, 1978, Papkoff et al., 1978; Damm et al., 1990; Legardinier et al., 2005a).

El mecanismo a través del cual la eCG (o la LH) estimula la síntesis de progesterona es a través de estimular el transporte de colesterol al interior de la membrana mitocondrial interna (Devoto et al., 2002), donde el complejo enzimático colesterol P450_{scc} segmenta la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona (Watson et al., 2000). Este transporte es regulado por la proteína StAR (Christenson y Strauss, 2001; Christenson y Devoto, 2003). Se ha demostrado que la proteína StAR se encuentra a niveles muy bajos tanto en las células de la granulosa como en células de la teca antes de que ocurra la oleada de LH (Chaffin et al., 2000; Kiriadou et al., 1996; Pescador et al., 1996). Se cree que la expresión del mRNA para la síntesis de StAR también es estimulada por la secreción de eCG (Watson et al., 2000).

Una vez que se activa la producción de pregnenolona, las células lúteas pueden proceder a transformarla en progesterona mediante la acción de la enzima 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa, la cual normalmente está activa y no necesita ser estimulada (Albrecht y Daels, 1997).

En las células ováricas la progesterona constituye el producto terminal de la esteroidogénesis cuando no existe actividad de la enzima 17 α hidroxilasa. Sin embargo, si esta última enzima está activa parte de la progesterona puede ser transformada a androstenediona, la que posteriormente puede continuar siendo metabolizada para formar testosterona, estrona y estradiol. La cantidad que se produzca de cada una de estas hormonas dependerá de la actividad relativa de

cada una de las otras enzimas involucradas en sus respectivas rutas biosintéticas (Albrecht y Daels, 1997). Así, al menos en teoría, la estimulación de la esteroidogénesis lútea por la eCG podría resultar en incrementos en las concentraciones de androstenediona, testosterona y/o estradiol. Los resultados del presente trabajos sugieren que esto si ocurre, ya que las yeguas gestantes con embrión equino, que producen cantidades mayores de eCG, tuvieron también concentraciones mayores de androstenediona y testosterona (figuras 5.3 y 5.4), aunque no de estradiol (figura 5.5). A continuación se analizan los hallazgos relativos a cada una de las hormonas.

En el caso de la androstenediona, las concentraciones promedio durante todo el periodo de muestreo fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) en yeguas con embrión equino ($365 \pm 32 \text{ pg.ml}^{-1}$) que en las yeguas con embrión mula ($35 \pm 32 \text{ pg.ml}^{-1}$); Figura 5.3). Además, en la figura 5.7 se muestra que en el caso de las gestaciones con embrión equino la curva de valores predichos de androstenediona se ajustaron mucho mejor a la de concentraciones promedio reales cuando la ecuación incluyó los efectos de la eCG, lo que demuestra que una parte importante de la androstenediona presente en la circulación se debe a la estimulación con eCG. Asimismo, en el caso de la gestación con embrión mula los efectos de la eCG permitieron un mejor ajuste de la curva durante las semanas 6 y 7, que corresponden precisamente al periodo de elevación de los niveles de eCG en este tipo de gestación.

Trabajos previos habían demostrado in vivo un incremento en las concentraciones de androstenediona en forma coincidente con el inicio de la secreción de eCG. Así, Daels et al. (1998) encontraron un marcado incremento en la secreción de androstenediona entre el día 35 y el día 45 de la gestación, pues antes del día 35 los niveles de androstenediona fueron basales, incrementándose a partir del día 35 hasta llegar a 600 pg.ml^{-1} en el día 45, resultados muy similares a los encontrados durante el mismo periodo en el presente trabajo (figura 5.3). Sin embargo, en el estudio de Daels et al. (1988) no se continuó estudiando la relación entre androstenediona y eCG en etapas más avanzadas de la gestación.

Daels et al. (1998) demostraron que el incremento en la producción de androstenediona que ocurre entre el día 35 y el día 45 en las yeguas gestantes no se produce si dichas yeguas carecen de cuerpo lúteo (gestación mantenida con altrenogest). También demostraron que es posible estimular la secreción de androstenediona en yeguas gestantes mediante la administración exógena de eCG, pero solo si dichas yeguas tienen un cuerpo lúteo. Por lo tanto, la aparente estimulación de la secreción de androstenediona por la eCG encontrada en el presente trabajo debió haber ocurrido a nivel del cuerpo lúteo, lo que es consistente con estudios in vitro en los que se ha demostrado un aumento en la expresión lútea de la enzima P450 17 α -hidroxilasa/17-20 liasa después del inicio de la secreción de eCG (Albrecht et al., 1996, 1997c; Albrecht y Daels, 1997; Albrecht et al., 1997b; Rodger et al., 1998).

En el caso de la testosterona, en el presente trabajo se encontró que las concentraciones fueron mayores en yeguas inseminadas con caballo que en yeguas inseminadas con burro (figura 5.4) precisamente durante el periodo (semanas 6 a 12) en que existen grandes diferencias en las concentraciones de eCG encontradas en ambos tipos de gestación (figura 5.1). Además, en el caso de las gestaciones con embrión equino la curva de concentraciones predichas de testosterona durante ese mismo periodo se ajustó mejor a la de concentraciones reales cuando se incluyeron los efectos de la eCG, indicando que la eCG contribuyó a estimular la secreción de testosterona (figura 5.8). En el caso de las gestaciones con embrión mula también se observó una diferencia en la curva predicha cuando se consideran los efectos de la eCG comparando con la curva predicha sin considerar esos efectos. Sin embargo, en este caso los efectos de la eCG solamente se observan en las semanas 6 a 8 (figura 5.8), que corresponden con el breve periodo de elevación de las concentraciones de eCG en este tipo de gestación (figura 5.1).

La producción de testosterona es resultado de la acción ejercida por la enzima 17 β hidroxisteroide deshidrogenasa (17 β HSD) sobre la molécula de androstenediona, transformándola en testosterona (Belin et al., 2000). En la yegua

no gestante la producción de andrógenos ocurre mayoritariamente en las células de la teca bajo el estímulo de LH (Sirois et al., 1991; Belin et al., 2000; Donadeu y Ginther, 2002). Sin embargo, en la yegua gestante la mayor parte de la testosterona es producida por el cuerpo lúteo (Daels et al., 1996). En un estudio previo, Daels et al. (1996) demostraron que las concentraciones de testosterona se elevan a partir del momento en que la yegua comienza a secretar eCG si la yegua tiene cuerpo lúteo, pero no en yeguas gestantes que carecen de cuerpo lúteo. En el presente trabajo se encontraron concentraciones de testosterona mucho más bajas que las de androstenediona, lo que sugiere que solamente una pequeña proporción de la androstenediona producida continúa por la vía metabólica de la 17β HSD, indicando que existe poca actividad de esta enzima. Esto podría indicar que la eCG no estimula la actividad de la 17β HSD, y que su efecto en la testosterona es indirecto, ya que al estimular la producción de androstenediona permite que exista mayor cantidad de sustrato disponible para ser transformado por la 17β HSD.

Daels et al. (1996) propusieron que el incremento en las concentraciones de testosterona que se produce en yeguas gestantes a partir del día 35 es dependiente de la eCG, mientras que un segundo incremento que ocurre después del día 50 es de origen fetoplacentario y por lo tanto independiente de la eCG. Dicha propuesta es consistente con los hallazgos del presente trabajo, ya que en las yeguas gestantes con embrión mula se produce un notorio incremento en las concentraciones de testosterona a partir de la semana 12 y en las yeguas gestantes con embrión equino a partir de la semana 14, siendo que en ambos casos ya no existen concentraciones circulantes de eCG.

Finalmente, en el presente trabajo no existe ninguna evidencia de un efecto estimulador de la eCG en la producción de estradiol en la yegua gestante, ya que no se observó ningún incremento en las concentraciones de estradiol asociado al gran incremento de eCG que se produce entre las semanas 5 y 8 de la gestación (figura 5.5). Además, durante las primeras 14 semanas de la gestación no existió

ninguna diferencia en las concentraciones de estradiol entre yeguas con embrión equino y yeguas con embrión mula a pesar de las grandes diferencias en las concentraciones de eCG de ambos tipos de yegua. Adicionalmente, las curvas de predicción de concentraciones de estradiol son muy similares si se incluyen o excluyen los efectos de la eCG (figura 5.9). Debe señalarse que en el presente trabajo se encontró un fuerte incremento en las concentraciones de estradiol a partir de la semana 15 de gestación, pero es evidente que dicho incremento no tiene relación alguna con la secreción de eCG (que ya no existe para ese momento), y posiblemente sea de origen feto-placentario.

Es importante destacar que Daels et al. (1998) encontraron que tanto la administración exógena de eCG como la producción endógena de la hormona resultan en un incremento en la secreción de estrógenos totales en la yegua gestante. También se ha señalado que el aumento en la secreción de estrógenos en respuesta a la eCG no parece estar mediado por una estimulación de la actividad de la enzima aromatasa, sino por el aumento en la cantidad de andrógenos disponibles como sustrato para esta enzima (Albrecht et al., 1997b; Daels et al., 1998). Esto podría explicar la aparente diferencia entre los resultados del presente trabajo y los de Daels et al. (1998) ya que ellos midieron estrógenos totales, que incluyen la estrona producida a partir de la aromatización de la gran cantidad de androstenediona presente en la yegua gestante además del estradiol producido a partir de la aromatización de las mucho menores concentraciones de testosterona. En cambio, en el presente trabajo se utilizó un ensayo específico para estradiol, que no detecta los cambios en las concentraciones de estrona, por lo que no se pudo observar lo sugerido por Terqui y Palmer (1979) quienes en base a lo encontrado en su trabajo, propusieron que el incremento en la secreción de estrógenos entre el día 30 y 40 era el resultado de la estimulación folicular por parte de la eCG, además Daels et al. (1991) encontraron picos de secreción de estrona, que siguen un patrón similar a la de secreción de eCG.

En la producción de estradiol en la yegua no gestante están involucradas tanto las células de la teca como las células de la granulosa del folículo (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Bergfelt et al., 2001). Sirois et al. (1991) mostraron resultados que sugieren una interacción celular en la cual las células de la granulosa sintetizan progesterona, una vez sintetizada esta pasa a las células de la teca y sufre cambios para ser convertida en andrógenos, que posteriormente pasan a las células de la granulosa, donde finalmente son aromatizados por la enzima aromatasa presente en estas células y son convertidos en estradiol (Schams y Berisha, 2002). En el caso de la gestación los estrógenos inicialmente parecen ser producidos en el cuerpo lúteo a partir de la aromatización de andrógenos (Albrecht et al., 1997b; Daels et al., 1998) aunque de manera interesante la enzima P450 aromatasa que convierte los andrógenos a estrógenos, sufre un descenso a partir del inicio de la secreción de eCG (Albrecht et al., 1995), lo que sugiere que en la síntesis de estrógenos durante la gestación temprana un paso limitante es la disponibilidad de andrógenos y no la actividad de la aromatasa.

Después del día 90 conforme la gestación progresa en la especie equina, las gónadas fetales empiezan a crecer y aumentan la secreción de sulfato de Dehidroepiandrosterona en la circulación fetal, y esta pasa a la placenta donde sufre aromatización (Ainworth y Ryan, 1966; Raeside y Liptrap, 1975; Pashen y Allen, 1979; Raeside et al., 1979) lo que se refleja en un aumento en las cantidades de estradiol, por lo que estas cantidades de estradiol encontradas después del día 90 en el presente trabajo probablemente son de origen fetal y no ovárico.

8. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo apoyan la hipótesis de que la eCG estimula la producción de progesterona, androstenediona y testosterona, por lo que las concentraciones de estas hormonas durante los primeros meses de la gestación son mayores en yeguas gestantes con caballo que en yeguas gestantes con burro. No se encontraron efectos de la eCG en la secreción de estradiol, pero no se puede descartar que la eCG sea capaz de estimular la síntesis de estrona u otros estrógenos.

9. LITERATURA CITADA

Adams AP, Antczak DF. Ectopic transplantation of equine invasive trophoblast. *Biology of Reproduction*. 2001;64:753-763.

Aggarwal BB, Farmer SW, Papkoff H and Seidel, Jr GE. Biochemical properties of equine chorionic gonadotropin from two different pools of pregnant mare sera. *Biology of Reproduction*. 1980a; 23:570-576.

Aggarwal BB, Farmer SW, Papkoff H, Stewart F, Allen WR. Purification and characterization of donkey chorionic gonadotropin. *Journal of Endocrinology*. 1980b;85:449-455.

Aggarwal BB, Papkoff H. Plasma clearance and tissue uptake of native and desialylated equine gonadotropins. *Domestic Animal Endocrinology*. 1985; 2: 173.

Ainsworth L, Ryan KJ. Oestrogen biosynthesis by mammalian placentae in vitro. *Internatl. Cong. Horm. Ster.* Edited by Romanoff EB, Martini L. *Excerpta Medica*, Amsterdam. 1966.

Albrecht BA, MacLeod JN, Daels PF. Cytochrome P450 aromatase mRNA levels decrease in equine luteal tissue after the onset of chorionic gonadotropin secretion. *Biology of Reproduction*. 1995;52:111.

Albrecht BA, Daels PF, MacLeod JN. Luteal cytochrome P450 17 α -hydroxylase-17,20-lyase (P45017 α) mRNA levels increase after the onset of chorionic gonadotropin secretion in pregnant mares. *Biology of Reproduction*. 1996;56:110.

Albrecht BA, Daels PF. Immunolocalization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase and cytochrome P450 aromatase in the equine corpus luteum of dioestrus and early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1997;111:127-133.

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

Albrecht BA, MacLeod JN, Daels PF. Expression of luteal cytochrome P450 aromatase (P450arom) before and after the onset of chorionic gonadotropin secretion in mares. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1997b;19:43.

Allen WR. The immunological measurement of pregnant mare serum gonadotropin. *Journal of Endocrinology*. 1969;43:593–598.

Allen WR, Moor RM. The origin of the equine endometrial cups. I: Production of PMSG by fetal trophoblast cells. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1972;29: 313–316.

Allen WR, Hamilton DW & Moor RM. The origin of the equine endometrial cups. II. Invasion of the endometrium by trophoblast. *Anatomical Record*. 1973;177:485-501.

Allen WR. Immunological aspects of the equine endometrial cup reaction. In: Edwards RG, Howe CWS, Johnson MH (eds) *Immunobiology of trophoblast*. Cambridge University Press.1975:217p.

Allen WR. Immunological aspects of endometrial cup reaction and the effect of xenogeneic pregnancy in horses and donkeys. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1982;31:57.

Allen WR, Kydd JH, Miller J and Antczak DF. Immunological studies on fetomaternal relationship in equine pregnancy. In *Immunological Aspects of Reproduction in Mammals*. Ed D.B. Crighton. Butterworths, London. 1983;183-194p.

Allen WR, Kydd JH, Miller J and Antczak DF,. Immunological studies on fetomaternal relationship in equine pregnancy. In *Immunological Aspects of Reproduction in Mammals*. Ed D.B. Crighton. Butterworths, London. 1984;183-193p.

Allen. Practical control of anoestrus in Thoroughbred broodmares. In: *Endocrine Causes of Seasonal and Lactational Anestrus in Farm Animals*. Edited by Ellendorff F. Martinus Nijhoff Publishers, Boston. 1985;98-107p.

Allen WR, Kydd JH, Boyle MS Antczak DF. Extraspecific donkey-in-horse pregnancy as a model of early fetal death. *Journal of Reproduction and Fertility*., Supplement. 1987;35:197-209.

Allen WR and Stewart F. Equine chorionic gonadotropin. In *Equine Reproduction*. Eds AO Mckinnon and JL Voss. Lea and Febiger, Philadelphia. 1993;81-96p.

Allen WR, Skidmore JA, Stewart F, et al. Effects of fetal genotype and uterine environment on placental development in equids. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1993;97:55-60.

Allen WR and Short RV. Interspecific and extraspecific pregnancies in equids: anything goes. *Journal of Heredity*. 1997;88:384-392.

Allen WR. The physiology of early pregnancy in the mare. *American Association of Equine Practitioners Proceedings*. 2000;46:338-354.

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

Allen WR, Luteal deficiency and embryo mortality in the mare, *Reproduction in Domestic Animals*. 2001b;36:121–131.

Allen WR and Stewart F. Equine placentation. *Reproduction Fertility and Development*. 2001;13:623-634.

Allen WR. The Development and Application of the Modern Reproductive Technologies to Horse Breeding. *Reproduction in Domestic Animals*. 2005;40:310-329.

Amoroso EC, Hancock JL, Rowlands IW. Ovarian activity in the pregnant mare. *Nature*. 1948;161:355-356.

Antczak DF, Bright SM, Remick LH and Bauman B. Lymphocyte alloantigens of the horse I. Serologic and genetic studies tissue antigens. 1982;20;172-187.

Arosh JA, Banu SK, Chapdelaine P, Madore E, Sirois J, Fortier MA. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology*. 2004;145:2551-2560.

Baezinger JU, Green. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagines-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1988;947:287.

Bahl OP, Thotakura NR, Anumula KR. Biological role of the carbohydrates in gonadotropins. In: Saxena BB (ed) *Hormone Receptors in Growth and Reproduction*. Raven Press, NY. 1984;165p.

Beg MA, Ginther OJ. Follicle selection in the cattle and horses: role of intrafollicular factors. 2006;132:365-377.

Belin F, Goudet G, Duchamp G, Gerard N. Intrafollicular concentrations of steroids and steroidogenic enzymes in relation to follicular development in the mare. *Biology of Reproduction*. 2000;62:1335-1343.

Bell RJ. Fertility and pregnancy loss following delay of foal oestrus with progesterone and estradiol 17 beta. MSc thesis, University of Saskatchewan, Saskatoon. 1985.

Bergfelt DR, Pierson RA, Ginther OJ. Resurgence of the primary corpus luteum during pregnancy in the mare. *Animal Reproduction Science*. 1989;21:261–270.

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

Bielanski W, Ewy Z, Pigiñiowa H, Differences in the level of gonadotrophins in the serum of pregnant mares. *Proceedings of the 3rd international congress on Animal Reproduction*. Cambridge, U.K. 1956;110p.

Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Brinsko SP, Rugby SL. *Manual of equine reproduction*. 2nd ed. USA: Mosby; 2003.

Boerboom D, Kerban A, Sirois J. Dual regulation of promoter II- and promoter 1f-derived Cytochrome P450 aromatase transcripts in equine granulosa cells during human chorionic gonadotropin-induced ovulation: a novel model for the study of aromatase promoter switching. *Endocrinology*. 1999;140:4133-4141.

Boerboom D, Sirois J. Equine P450 cholesterol side-chain cleavage and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase: molecular cloning and regulation of their messenger ribonucleic acids in equine follicles during the ovulatory process. *Biology of Reproduction*. 2001;64:206-215.

Boeta M and Zarco QL, Utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas, *Veterinaria Mexico*. 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. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2005;25:531-538

Bolt OJ. Influence of pregnancy and hysterectomy on the corpora lutea of ewes. *Journal of Animal Science*. 1966;25:919 (abstract).

Bousfield GR, Liu W-K, Sugino H, Ward DN. Structural studies on equine glycoprotein hormones amino acid sequence of equine luteinizing hormone beta subunit. *The Journal of Biological Chemistry*. 1987;262:8610.

Bousfield GR, Butnev VY, Gotschall RR, Baker VL, Moore WT. Structural features of mammalian gonadotropins. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1996;125:3-19.

Bousfield GR, Butnev VY. Identification of twelve O-glycosylation sites in equine chorionic gonadotropin β and equine luteinizing hormone β by solid-phase Edman degradation. *Biology of Reproduction*. 2001;64:136-147.

Butnev VY, Gotschall RR, Baker VL, Moore WT, Bousfield GR. Negative influence of O-linked oligosaccharides of high molecular weight equine chorionic gonadotropin on its luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor-binding activities. *Endocrinology*. 1996;137:2530-2542.

Catchpole HR, Cole HH, Pearson PG. Studies on the rate of disappearance and fate of mare gonadotropic hormone following intravenous injection. *American Journal of Physiology*. 1935;112:21.

Chaffin CL, Dissen GA and Stouffer RL. Hormonal regulation of steroidogenic enzyme expression in granulosa cells during the peri-ovulatory interval in monkeys. *Molecular Human Reproduction*. 2000;6:11-18.

Charnock-Jones DS, Smith SK. Vascular endothelial growth factor and corpus luteum angiogenesis. *Angiogenesis*. 1998;2:119-121.

Christakos S, Bahl OP. Pregnant mare serum gonadotropin: purification and physicochemical, biological, and immunological characterization. *The Journal of Biological Chemistry*. 1979;254:4253.

Chopineau M, Martinat N, Marichaou H, Troispoux C, Auge-Gouillou C, Stewart F, Combarnous Y and Guillou F. Evidence that the alpha-subunit influences the specificity of receptor binding of the equine gonadotrophins. *Journal of Endocrinology*. 1997;155:241-245.

Chopineau M, Martinat N, Gibrat JF, Galet C, Lecompte F, Foulon-Gauze F, Pourchet C, Guillou F, Combarnous Y. Identification of amino-acids in the α -subunit first and third loops that are crucial for the heterospecific follicle-stimulating hormone activity of equid luteinizing hormone/choriogonadotropin. *European Journal of Endocrinology*. 2004;150:877-884.

Christenson LK, Strauss III JF. Steroidogenic acute regulatory protein: an update on its regulation and mechanism of action. 2001;32:576-586.

Christenson LK and Devoto L. Cholesterol transport and steroidogenesis by the corpus luteum. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2003;90:1-9.

Clegg MT, Cole HH, Howard CB, Pigon H. The influence of foetal genotype on equine gonadotropin secretion. *Journal of Endocrinology*. 1982;25:245.

Cole HH, Hart GH. The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. *American Journal of Physiology*. 1930;93:57.

Cole HH, Howell CF, and Hart GH. The changes occurring in the ovary of the mare during pregnancy *The Anatomical Record*. 1931;49:199-209.

Couture L, Lemonnier JP, Troalen F, Roser JF, Bousfield GR, Bellet D, Bidart JM. Immunochemical studies of equine chorionic gonadotropin (eCG), eCG α , and eCG β . *Endocrinology*. 1993;132:205-211.

Crump A, Donaldson WL, Miller J, Kydd JH, Allen WR, Antczak DF. Expression of major histocompatibility complex (MHC) antigens on horse trophoblast. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1987;35:379.

Daels PF, Shideler S, Lasley BL, Hughes JP, Stabenfeldt GH. Source of oestrogen in early pregnancy in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility* 1990;90:55-61.

Daels PF, DeMoraes MJ, Stabenfeldt GH, Hughes JP, Lasley BL. The corpus luteum: a major source of estrogen during early pregnancy in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 1991a;44:501-508.

Daels PF, Ammon DC, Stabenfeldt GH, Liu IKM, Hughes JP, Lasley BL. Urinary and plasma estrogen conjugates, estradiol and estrone concentrations in nonpregnant and early pregnant mares. *Theriogenology* 1991b;35:1001-1017.

Daels PF, Albrecht BA, Mohammed HO. In-vitro regulation of luteal function in mares. *Reproduction in Domestic Animals* 1995;30:211-217.

Daels PF, Chang GC, Hansen B, Mohammed HO. Testosterone secretion during early pregnancy in mares. *Theriogenology* 1996;45:1211-1219.

Daels PF, Albrecht BA, Mohammed HO. Equine Chorionic Gonadotropin Regulates Luteal Steroidogenesis in Pregnant Mares. *Biology of Reproduction*. 1998;59:1062-1068.

Damm JBL, Hard K, Kamerling JP, van Dedem GWK, Vliegenthart JFG. Structure determination of the major N- and O linked carbohydrate chains of the beta subunits from equine chorionic gonadotropin. *European Journal of Biochemistry*. 1990;189:175.

Day FT, Rowlands IW. Serum gonadotrophin in Welsh and Shetland ponies. *Journal of Endocrinology*. 1947;5:1.

Devoto L, Kohen P, Gonzalez RR, Castro O, Retamales I, Vega M, Carvallo P, Christenson LK, Strauss III JF. Expresión of steroidogenic acute regulatory protein in the human corpus luteum throughout the luteal phase. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86:5633-5639.

Devoto L, Kohen P, Vega M, Castro O, Gonzalez RR, Retamales I, Carvallo P, Christenson LK and Strauss JF: Control of human luteal steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002;186:137-141.

Diaz Chico BN. Bioquímica básica de las hormonas esteroideas: Biología y Clínica del Cáncer. *Biocancer*. 2004; Vol; 2, pp:1-22.

Diaz Chico BN, Navarro Bosch D, Zumbado Peña M. Hormonas y cáncer: carcinogénesis mamaria por estrógenos. *Biocancer*. 2004;1:1-14.

Diaz FJ, Anderson LE, Wu YL, Rabot A, Tsai SJ and Wiltbank MC: Regulation of progesterone and prostaglandin F₂ alpha production in the CL. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002;191:65-80.

Donadeu FX, Ginther OJ. Effect of number and diameter of follicles on plasma concentrations of inhibin and FSH in mares. *Reproduction* 2001; (in press).

Donadeu FX and Ginther OJ. Changes in follicular fluid factors during follicle selection in mares. *Biology of Reproduction*. 2002;66:1111-1118.

Donadeu FX, Watson ED. Seasonal changes in ovarian activity: lessons learnt from the horse. *Animal Reproduction Science*. 2007;100:225-242.

Donaldson WL, Zhang CH, Oriol JG, Antczak DF. Invasive equine trophoblast expresses conventional class I major histocompatibility complex antigens. *Development*. 1990;110:63-71.

Donaldson WL, Oriol JG, Plavin A, Antczak DF. Development regulation of class I major histocompatibility complex antigen expression by equine trophoblast cells. *Differentiation*. 1992;52:69-78.

Enders AC, Meadows S, Stewart F, Allen WR. Failure of endometrial cup development in the donkey-in-horse model of equine abortion. *Journal of Anatomy*. 1996;188:575-589.

Farmer SW, Papkoff H. Immunochemical Studies with Pregnant Mare Gonadotropin. *Biology of Reproduction*. 1979;21:425-431.

García ME. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. México (DF) Universidad Nacional Autónoma de México. 1981.

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

Gastal EI, Gastal MO, Wiltbank, Ginther OJ. Follicle Deviation and intrafollicular and systemic estradiol concentrations in mares. *Biology of Reproduction*. 1999b; 61:31-39.

Gastal EL, Rodrigues BL, Gastal MO, Beg MA, Ginther OJ. Responsiveness of the corpus luteum to PGF₂ α and resulting progesterone, LH, and FSH interrelationships in mares. *Animal Reproduction*. 2005;2:240-249.

Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Reproduction*. 2006;131:699-709.

Gigli I, Russo A, Agüero A. Consideraciones sobre la dinamica ovarica en equino, bovino y camelidos sudamericanos. In *Vet*. 2006;8:1514-6634(soportepapel), 1668-3498(on line).

Ginther OJ. *Reproductive Biology of The Mare*. McNaughton and Gunn, Ann Arbor, MI. 1979:268p.

Ginther OJ. *Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare (2nd ed.)*, Cross Plains (Wisc): Equiservices.1986.

Ginther OJ. *Reproductive biology of the mare, Basic and Applied Aspects*, 2nd edn. Cross Plains; Equiservices. 1992a.

Ginther OJ. *Endocrinology of pregnancy*. In: *Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects*, 2nd edn, Cross Plain: Equiservices. 1992b;419-456p.

Ginther OJ. *Equine pregnancy: Physical interactions between the uterus and conceptus*. American Association of Equine Practitioneres. *Proceedings*. 1998;44: 73-104.

Ginther OJ, Beg MA, Gastal MO, Gastal EL. Follicle dynamics and selection in mares. *Animal Reproduction*. 2004a;1:45-63.

Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. Seasonal influence on equine follicle dynamics. *Animal Reproduction*. 2004b;1:31-44.

Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Bergfelt DR, Baerwald AR, Pierson RA. Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and women. *Biology of Reproduction*. 2004c; 71: 1195-1201.

Ginther OJ, Beg MA, Gastal EL, Gastal MO, Baerwald AR, Pierson RA. Systemic concentrations of hormones during the development in follicular waves in mares and women: a comparative study. *Reproduction*. 2005a; 130: 379-388.

Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effect of ovarian hormones in mares. *Biology of Reproduction*. 2005b. 73: 315-323.

Gore-Langton RE, Armstrong DT. Follicular steroidogenesis and its control. In : Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition. New York :Raven Press . 1994;571-627.

Gospodarowicz D, Papkoff H. A simple method for the isolation of pregnant mare serum gonadotropin. *Endocrinology*. 1967;80:699.

Gospodarowicz D. Purification and physicochemical properties of the pregnant mare serum gonadotropin (PMSG). *Endocrinology*. 1971;91:101.

Grunig GG, Triplett L, Canady LK, et al. The maternal leucocyte response to the endometrial cups in horses is correlated with the developmental stages of the invasive trophoblast cells. *Placenta* 1995;16:539-559.

Guillou F, Combarrous Y. Purification of equine gonadotropins and comparative study of their acid-dissociation and receptor-binding specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1983;755:229.

Hamilton DW, Allen WR, Moor RM. The origin of equine endometrial cups III. Light and electron microscopic study of fully developed equine endometrial cups. *Anatomical Record*. 1973;177:503–518.

Harrison RJ. The early development of the corpus luteum in the mare. *Journal of Anatomy*. 1946;80:160-166.

Hasewaga T, Sato F, Nambo Y, Ishida N. Expression of Steroidogenic Enzyme Genes in the Equine Feto-Placental Unit. *Journal of Equine Science*. 2001;12:25-32.

Holtan DW, Nett TM, Estergreen VL. Plasma progestins in pregnant, postpartum and cycling mares. *Journal of Animal Science*. 1975;40;2.

Holtan DW, Squires EL, Lapin DR, Ginther OJ. Effect of ovariectomy on pregnancy in mares. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 1979;27:457-463.

Kamerling JP, Damm JBL, Hard K, van Dedem GWK, de Boer W, Vliegthart JFG. Differences in structure of carbohydrate chains of human and equine chorionic gonadotropins. In: Chin WW, Boime I (eds) *Glycoprotein Hormones*. Serono, Norwell, MA. 1990:123.

Kerban A, Boerboom D, Sirois J. Human chorionic gonadotropin induces an inverse regulation of steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid in the theca interna and granulosa cells of equine preovulatory follicles. *Endocrinology*. 1999;140:667-674.

Kiriakidou M, McAllister JM, Sugawara T and Strauss JF: Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1996;81:4122-4128.

Knobil E. On the regulation of the primate corpus luteum. *Biology of Reproduction*. 1973;8:246-258.

Knobil E, Neil JD. *Encyclopedia of reproduction*. Equine chorionic gonadotropin. ACADEMIC PRESS. 1998;2:29 -36.

Kydd J, Miller J, Antczak DF, et al. Maternal anti-fetal cytotoxic antibody responses of equids during pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1982;32:361-369.

Kydd JH, Butcher GW, Antczak DF, Allen WR. Expression of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules on early trophoblast. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 1991;44:463-477.

Legardinier S, Cahoreau C, Klett D, Combarnous Y. Involvement of equine chorionic gonadotropin (eCG) carbohydrate side chains in its bioactivity; lessons from recombinant hormone expressed in insect cells. *Reproduction, Nutrition, Development*. 2005a;45:255-259.

Legardinier S, Klett D, Poirier JC, Combarnous Y, Cahoreau C. Mammalian-like non-sialyl complex-type N-glycosylation of equine gonadotropins in MimicTM insects cells. *Glycobiology*. 2005b;15:776-790.

LeMarie WJ, Conloy PW, Moffett A, Spellacy WN, Cleveland WW and Savard K. Functions of the human corpus luteum during puerperium. Its maintenance by exogenous hCG. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 1971;110:612-618.

Licht P, Bona Gallo A, Aggarwal BB, Farmer SW, Castelino JB, Papkoff H. Biological and binding activities of equine pituitary gonadotropins and pregnant mare serum gonadotropin. *Journal of Endocrinology*. 1979;83:311.

Lin D, Sugawara T, Strauss III JF, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A, Miller WL. *Science*. 1995;267:1828-1831.

Lofstedt RM. Some aspects of manipulative and diagnostic endocrinology of the broodmare. *Proceedings of The Annual Meeting Society for Theriogenology*, Rochester. 1986;67-93.

Manning AW, Rajkumar K, Bristol F, Flood PF, Murphy BD. Genetic and temporal variation in serum concentrations and biological activity of horse chorionic gonadotrophin. *Journal of Reproduction and Fertility (Suppl)*. 1987;35:389.

Manning AW. Genetic and enzymatic modification of equine chorionic gonadotrophin. MSc Thesis, University of Saskatchewan. 1989.

Manzella SM, Dharmesh SM, Beranek MC, Swanson P, Baenziger JU. Evolutionary conservation of the sulfated oligosaccharides on vertebrate glycoprotein hormones that control circulatory half-life. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995;270:21665-21671.

Martin-Rosset, W. *La alimentación de los caballos*, Barcelona (España). Aedos. 1993:229p.

Martinuk SD, Bristol F, Murphy BD. Effects of the dam on equine chorionic gonadotropin concentrations during pregnancy. *Domestic Animal Endocrinology*. 1990a;7:551.

Martinuk SD, Rajkumar K, Murphy BD. Comparison of circulating and placental forms of equine chorionic gonadotropin. *Domestic Animal Endocrinology*, in press. 1990b.

Martinuk SD, Manning AW, Black WD, Murphy BD. Effects of carbohydrates on the pharmacokinetics and biological activity of equine chorionic gonadotropin in vivo. *Biology of Reproduction*. 1991;45:598-604.

Matteri RL, Papkoff H, Murphy HMS, Roser JF, Chang Y-S. Comparison of the properties of highly purified equine chorionic gonadotrophin isolated from commercial concentrates of pregnant mare serum and endometrial cups. *Domestic Animal Endocrinology*. 1986;3:39.

Matteri RL, Papkoff H. Characterization of equine luteinizing hormone by chromatofocusing. *Biology of Reproduction*. 1987;36:261.

McIntosh JEA, Moor RM Allen WR. Pregnant mare serum gonadotropin: rate of clearance from the circulation of sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1975;44: 95

Mindnich R, Moller G, Adamski J. The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular Cellular Endocrinology*. 2004; 218: 7-20.

Moore Jr WT, Ward DN. Pregnant mare serum gonadotropin: an in vitro characterization of the luteotropin-follitropin dual activity. *Journal of Biological Chemistry*. 1980;250:6930.

Murphy BD, Rajkumar K, Bristol F, Flood PF, Chedrese PJ. Efecto del genótipo del semental y la edad de la yegua sobre los niveles de gonadotropina coriónica equine. *Revista de Medicina Veterinaria (B Aires)*. 1985;66:72.

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

Nett TM and Pickett BW. Effect of diethylboestrol on the relationship between LH, PMSG and progesterone during pregnancy in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 1979;27:465-470.

Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollynson MK and Mcintush EW. Mecanismos que controlan la function y el periodo de vida del cuerpo luteo. *Physiological Reviews*. 2000;80:1-29.

Papadopoulos V, Amri H, Boujard N, Cascio C, Culty M, Garnier M, Hardwick M, Li H, Vidic B, Brown AS, Reversa JL, Bernassau JM, Drieu K. Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids*. 1997;62:21-28.

Papkoff H. Relationship of PMSG to the pituitary gonadotropins. In: Sreenan JM (ed) *Control of reproduction in the cow*. Martinus Nijhoff, The Hague. 1978;73.

Papkoff H, Bewley TA, Ramachandran J. Physicochemical and biological characterization of pregnant mare serum gonadotropin and its subunits. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1978;532:185.

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

Perkins NR, Therlfall WR, Ottobre JS. Pulsatile secretion of luteinizing hormone and progesterone in mares during the estrous cycle and early pregnancy. *American Journal of Veterinary Research*. 1993;54:1929-1934.

Pescador N, Soumano K, Stocco DM, Price CA and Murphy BD: Steroidogenic acute regulatory protein in the bovine corpora lutea. *Biology of Reproduction*. 1996; 55:485-491.

Pierce JG, Parsons TF. Glycoproteins hormones: structures and function. *Annual Reviews in Biochemistry*. 1981;50:465.

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

Raeside JI, Liptrap RM. Patterns of urinary strogens excretion in individual pregnant mares. *Journal of Reproduction amd Fertility*. 1975;23:469-475.

Reaside JI. Liptrap RM, McDonell WN & Milne FJ.. A precursor role for DHA in a feto-placental unit for oestrogen formation in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 1979;27:493-497.

Rodger FE, Illingworth PJ, Watson ED. Immunolocalization of P450C17 in the mare corpus luteum. *Theriogenology*. 1998; 50:321-333.

Roser J F, and Lofstedt R. M. Urinary eCG patterns in the mare during pregnancy. *Theriogenology*. 1989;32:607-622.

Rowlands IW. Serum gonadotrophin and ovarian activity in the pregnant mare. *Journal of Endocrinology*. 1949;6:184.

Rowlands IW. Levels of gonadotrophin in tissues and fluids with emphasis on domestic animals. In: Cole HH, ed. *Gonadotrophins; their chemical and biological properties and secretory control*. San Francisco: WH Freeman and Co. 1963;74-112.

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

Saint-Dizier M, Foulon-Gauze F, Lecompte F, Combarous Y and Chopineau M. Cloning and functional expression of the equine luteinizing hormone/chorionic gonadotrophin receptor. *Journal of Endocrinology*. 2004; 183:551-559.

Sairam MR, Yarney TA, Bhargavi GN, Sanford LM. Conformational restrictions of the sheep testicular receptor discriminates pituitary lutropin and placental gonadotropins. *Journal of Biological Chemistry*. 1988;263:3706.

Sanderson JT. The steroid biosynthesis pathways as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences*. 2006; Vol: 94, No: 1, pp: 3-21.

Sandhoff TW nad McLean MP: Regression of the rat steroidogenic acute regulatory (StAR) protein gene by PGF₂α is modulated by the negative transcription factor DAX-1. *Endocrine*. 1999;10:83-91.

Schams D, Papkoff H. Chemical and immunochemical studies on pregnant mare serum gonadotropin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1972;263:139.

Schams D, Menzer C, Schallenberger E, Hoffman B, Hahn J, Hahn R. Some studies on pregnant mare serum gonadotropin and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. In: Sreenan JM (ed) *Control of Reproduction in the Cow*. Martinus Nijhoff, The Hague. 1978;122.

Schams D & Berisha B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology*. 2002;23:53-65.

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. *Molecular Endocrinology*. 1992;6:951-959.

Short RV. Implantation and the maternal recognition of pregnancy. In Wolstenholme GEW, O'Connor M, eds. *Ciba Foundation Symposium on Foetal Autonomy*. London: J and A Churchill. 1969;2-26.

Silberzahn P, Zwain I, Martin B. Concentration increase of unbound testosterone in plasma of the mare throughout pregnancy. *Endocrinology*. 1984;1151:416-419.

Simpson ER, Davis SR. Minireview: aromatase and regulation of estrogen biosynthesis: Some new perspectives. *Endocrinology*. 2001;142:4589-4594:

Sirois J, Kimmich TL, Fortune JE. Steroidogenesis by equine preovulatory follicles: relative roles of theca interna and granulosa cells. *Endocrinology*. 1991;128,1159-1166

Smith PL, Bousfield GR, Kumar S, Fiete D, Baezinger JU. Equine lutropin and chorionic gonadotropin bear oligosaccharides terminating with SO₄-4-GalNAc and Sia α 2,3 Gal, respectively. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268: 795-802.

Spicer LJ, Santiago CA, Davidson TR, Bridges TS, Chamberlain CS. Follicular fluid concentrations of free insulin-like growth factor (IGF)-I during follicular development in mares. *Domestic Animal Endocrinology*. 2005;29:573-581.

Spincemaille J, Bouters R, Vandeplassche M, Bonte P. Some aspects of endometrial cup formation and PMSG production. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 1975;23:415.

Squires EL, Garcia MC, and Ginther OJ, Effects of pregnancy and hysterectomy on the ovaries of pony mares. *Journal of animal science*. 1974a;38:823-830.

Squires EL, Wenworth BC, and Ginther OJ, Progesterone concentration in blood of mares during the estrous cycle, pregnancy and after hysterectomy. *Journal of animal science*. 1974b;39:759-767.

Squires EL, Douglas RH, Steffenhagen WP & Ginther OJ. Ovarian changes during the estrous cycle and pregnancy in mares. *Journal of Animal Science*. 1974c;38:330-338.

Squires EL and Ginther OJ, Collection technique and progesterone concentrations of ovarian and uterine venous blood in mares. *Journal of animal science*. 1975a;40:275-281.

Squires EI, Ginther OJ. Follicular and luteal development in pregnant mares. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 1975b;23:429-433.

Squires EL, Stevens WB, Pickett BW, Nett TM. Role of pregnant mare serum gonadotropin in luteal function of pregnant mares. *American Journal of Veterinary Research*. 1979;40:889.

Squires EL, Endocrinology of pregnancy. In: AO McKinnon and JL Voss, Editors, *Equine reproduction*, Lea & Febiger, Philadelphia.1993;495–500.

Starbuck GR , Stout TAE, Lamming GE, et al. Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the estrous cycle and early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1998;113:173-179.

Stewart F, Allen WR, Moor RM. Pregnant mare serum gonadotrophin: ratio of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay. *Journal of Endocrinology*. 1976;71:371.

Stewart F, Allen WR, Moor RM. Influence of foetal genotype on th follicle-stimulating hormone: luteinizing hormone ratio of the pregnant mare serum gonadotropin. *Journal of Endocrinology* 1977;73:419.

Stewart F, Allen WR. The binding of FSH, LH and PMSG to equine gonadal tissues. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1979;27:431.

Stewart F, Allen WR., Biological functions and receptor-binding activities of equine chorionic gonadotrophins. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1981;62:527-536.

Stewart F. Thomson JA. Leigh SEA, Warwick JM. Nucleotide (cDNA) sequence encoding the horse gonadotropin alfa subunit. *Journal of Endocrinology* 1987;115:341

Stocco DM. Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochimica et Biofysica Acta*. 2000a;1486:184-197.

Stocco DM. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *Journal of Endocrinology*. 2000b:164:247-253.

Stocco DM, Clark BJ, Reinhart AJ, Williams SC, Dzson M, Dassi B, Walsh LP, Manna PR, Wang X, Zeleznik AJ and Oriz J: Elements involved in the regulation of the StAR gene. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2001, 177: 55-59.

Stockwell-Hartree A. Multiple forms of pituitary and placental hormones. *Oxford Reviews in Reproductive Biology*. 1989;11:47.

Stout TAE, Allen WR. Conceptus factors involved in the maternal recognition of pregnancy in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1996;17:53.

Stout TAE, Lamming GE, Allen WR. Oxytocin and its endometrial receptor are integral to luteolysis in the cycling mare. *Journal of Reproduction and Fertility*. 2000;56 (in press).

Sugino H. Bousfield GR, Moore Jr WT. Ward DN. structural studies on equine glycoproteins hormones. *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262:8603

Terqui M and Palmer E. Oestrogen pattern during early pregnancy in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 1979;27:441-446.

Thompson Jr DL, Reville SI, Derrick DJ. Short- term mode of secretion of equine chorionic gonadotropin and the effect of GnRH. *Theriogenology*. 1982;18:583-591.

Thway TM, Clay CM, Maher JK, Reed DK, McDowell KJ, Antczack DF, Eckert RL, Nilson JH, Wolfe MW. Immortalization of equine trophoblast cell lines of chorionic girdle cell lineage by simian virus-40 large T antigen. *Journal of Endocrinology*. 2001;171:45-55.

Urwin VE and Allen WR. Pituitary and chorionic gonadotropin control of ovarian function during early pregnancy in equids. *Journal of Reproduction and Fertility.*, Supplement. 1982;32:371-381.

Vagnoni KE, Ginther OJ, Lunn DP. Expression of major histocompatibility complex antigen and timing of invasion by equine chorionic girdle cells cultured on matrigel. *Biology of Reproduction.* 1996;54:219-223.

Van Nierkerk CH, Allen WR. Early embryonic development in the horse. *Journal of Reproduction and Fertility* 1975;23:495-498.

Ward DN, Moore Jr WT, Burleigh BD. Structural studies on equine chorionic gonadotropin. *Journal of Protein Chemistry.* 1982;1:263.

Watson ED, Bjorkstein TS, Buckingham J, et al. Immunolocalization of oxytocin in the uterus of the mare. *Journal of Reproduction and Fertility.* 1997;20:31.

Watson ED, Thomson SRM, Howie AF. Detection of steroidogenic acute regulatory protein in equine ovaries. *Journal of Reproduction and Fertility.* 2000;119:187-192.

Webb R, Woad KJ, Armstrong DG. Corpus luteum (CL) function: local control mechanisms. *Domestic Animal Endocrinology.* 2002;23:277-285.

YoungLai EV and Jarrel JF. *Acta Endocrinology.* 1983;104:227-232.

Zarco L, Boeta M. *Reproducción Equina.* Editado por la Universidad Nacional Autónoma de México, Tercera edición. 2000.