



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**DISMINUCIÓN DE LA SECRECIÓN DE LA HORMONA
LUTEINIZANTE POR MEDIO DE UN AGONISTA DE GnRH
PARA ESTUDIAR LA DEPENDENCIA GONADOTRÓPICA
DEL CUERPO LÚTEO EN LA VACA GESTANTE**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

TÓBELE DALILA TORIZ HERNÁNDEZ

TUTOR:

DR. ANTONIO ISMAEL PORRAS ALMERAYA

COMITÉ TUTORAL:

DR. CARLOS GUILLERMO GUTIÉRREZ AGUILAR

DR. JAIME GALLEGOS SÁNCHEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

Disminución de la secreción pulsátil de la hormona luteinizante por medio del tratamiento crónico con un agonista de GnRH para estudiar la dependencia gonadotrópica del cuerpo lúteo en la vaca gestante. Toriz HT, Basurto H, Porras AA, Gutiérrez CG.

Se probó la hipótesis de que la disminución de la secreción pulsátil de LH por la aplicación constante de un agonista de GnRH no afecta la funcionalidad lútea en la vaca gestante. Se utilizaron 12 vacas F1 con 90 días de gestación aproximadamente, divididas en dos grupos. A las vacas del grupo tratado (n = 6) se les insertó subcutáneamente una bomba osmótica, la cual liberaba 2.5 µg/h de buserelin (agonista de GnRH) en forma continua y reemplazándose cada 28 días, para mantener la liberación del agonista hasta el parto. Seis vacas más sirvieron como testigo. A todos los animales se les tomó muestras sanguíneas 2 veces por semana desde el día 98 hasta el día 150 de gestación, a partir de este día la frecuencia de muestreo cambió a cada 15 días hasta la ocurrencia del parto. Para evaluar la capacidad de liberación de LH por la hipófisis, a todas las vacas se les administró 50 µg de GnRH intramuscularmente 40 días después de iniciado el experimento. Se midió progesterona y LH por medio de RIA. Todas las vacas continuaron su gestación y parieron normalmente. Las vacas tratadas ovularon y formaron un segundo cuerpo lúteo en respuesta a la inserción de la primera bomba osmótica. Las concentraciones de progesterona fueron más altas ($P < 0.05$) en el grupo tratado (13.2 ± 0.34 ng/mL) que en el grupo testigo (6.1 ± 0.37 ng/mL) a través de la gestación. Similarmente, las concentraciones de LH fueron más altas en las vacas tratadas. No obstante, la respuesta de la pituitaria al estímulo de la GnRH fue bloqueada por el tratamiento crónico con el agonista de GnRH, mientras que los animales testigo respondieron con la liberación de LH. El tratamiento crónico con el agonista de GnRH incrementó las concentraciones basales de LH y progesterona. La concentración basal incrementada de LH es suficiente para mantener la función del CL en ausencia de la secreción pulsátil de LH.

Palabras claves: cuerpo lúteo, LH, vaca preñada, agonista, GnRH.

ABSTRACT

Decreased pulsatile LH secretion does not affect the function of the corpus luteum of pregnancy in cattle. Toriz HT, Basurto H, Porras AA, Gutiérrez CG.

Luteinizing hormone (LH) is necessary for corpus luteum function. An increase in LH secretion enhances progesterone output during diestrus. However, during pregnancy, LH release is decreased by the high progesterone concentrations produced by the corpus luteum (CL). Thus, the objective of this study was to determine the CL dependence on pulsatile LH secretion in pregnant cattle. Twelve cows with 98 days of pregnancy were either used as controls (n=6) or treated chronically with a GnRH agonist (buserelin acetate; n=6) released continuously at 2.5 µg/h by an osmotic pump (Alzet 2ML4). The pump was replaced every 28 days with a new pump throughout gestation. Cattle were bled twice weekly from day 90 to day 150 of gestation and every fortnight thereafter until parturition. The ability of the pituitary from the control and GnRHa treated cows to release LH was tested forty days after the start of the study by injecting them with 50 µg of native GnRH. Progesterone and LH were measured by RIA. All cows continued their pregnancy and calved normally. After the first GnRHa pump was inserted, treated cows developed a secondary CL. Progesterone concentrations were higher ($P < 0.05$) in the GnRHa treated cattle (13.2 ± 0.34 ng/mL) than in the control group (6.1 ± 0.37 ng/mL) throughout the remaining of pregnancy. Similarly, LH concentrations were higher in treated cattle. Nonetheless, the pituitary LH response to the GnRH stimulus was blunted 6 weeks after the initiation of the GnRHa chronic treatment while control animals did respond with LH release. Chronic treatment with GnRHa inhibits the pituitary response to an acute GnRH stimulus. GnRHa chronic treatment increased basal LH and progesterone concentrations. Increased basal concentration of LH is sufficient to maintain CL function in the absence of pulsatile LH release.

Key words: corpus luteum, LH, pregnant cow, agonist, GnRH

CONTENIDO	Página
CONTENIDO.....	I
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	III
DECLARACIÓN.....	IV
DEDICATORIAS.....	V
AGRADECIMIENTOS.....	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS Y OBJETIVO.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Ciclo estral.....	4
Endocrinología de la fase lútea.....	4
Ovulación.....	5
Luteinización.....	6
Luteólisis.....	7
Gestación.....	9
Reconocimiento materno de la gestación.....	9
Placenta.....	9
Endocrinología de la gestación.....	10
Cuerpo Lúteo.....	10
Control endocrino de la formación y función del cuerpo lúteo.....	11
Células lúteas no esteroideogénicas	12
Células lúteas esteroideogénicas.....	12
Comunicación celular.....	13
Otras sustancias.....	13
Cuerpo lúteo de la gestación.....	14
Hormona luteinizante.....	14
Patrón de secreción de LH	15
Progesterona.....	16
Control agudo de la secreción de progesterona.....	17
Control crónico de la secreción de progesterona.....	17

Fuentes extraordinarias de Progesterona.....	17
Otras hormonas que participan en la formación y mantenimiento del cuerpo lúteo.....	18
Hormona del crecimiento.....	18
Prolactina.....	18
Factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-I).....	19
Lactógenos placentarios.....	20
Estrógenos.....	20
Prostaglandinas.....	20
GnRH y análogos.....	21
GnRH.....	21
Receptor.....	22
Análogos.....	23
Agonistas.....	23
Antagonistas.....	24
MATERIAL Y METODOS.....	25
Ubicación geográfica.....	25
Unidades experimentales.....	25
Diseño experimental.....	25
Muestreo sanguíneo.....	25
Desafío a la hipófisis con GnRH.....	26
Radioinmunoanálisis.....	26
Análisis Estadístico.....	26
RESULTADOS.....	27
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES.....	38
LITERATURA CITADA.....	39

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

- Figura 1. Concentraciones promedio de progesterona en vacas testigo (-○-) y vacas con un tratamiento crónico con 2.5 µg/hora de buserelín (-●-).28
- Figura 2. Concentraciones promedio de LH en vacas testigo (-○-) y en vacas con un tratamiento crónico con 2.5 µg/hora de buserelín (-●-).30
- Figura 3. Concentraciones promedio de progesterona en vacas tratadas (-●-) o no (-○-), durante el desafío que se realizó a la hipófisis con GnRH.31
- Figura 4. Concentraciones promedio de LH en vacas tratadas (-●-) o no (-○-), durante el desafío que se realizó a la hipófisis con GnRH. Se observa también el comparativo con el logaritmo de LH en los dos primeros muestreos anteriores a la administración de GnRH.33

1. INTRODUCCIÓN

El cuerpo lúteo (CL) en la vaca, es una glándula ovárica temporal (Arosh *et al.*, 2004), que resulta de la luteinización del folículo terciario al ovular, es decir, cuando es liberado el ovocito para ser fecundado (Arikan y Yigit, 2001). Si el ovocito es fecundado por un espermatozoide, el cuerpo lúteo que se forma se le denomina *corpus luteum verum*.

La luteinización comienza, con el pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH) que se presenta en el estro. La luteinización es un mecanismo complejo, donde ocurre principalmente, la transformación de las células de la granulosa en células lúteas grandes y de las células de la teca en células lúteas pequeñas (Fields y Fields, 1996; Richards *et al.*, 1998); además la formación de una amplia red de capilares, ya que el cuerpo lúteo es la estructura que crece más rápido y más irrigado está en todo el organismo (Acosta y Miyamoto, 2004). Se dice que el cuerpo lúteo alcanza su máxima funcionalidad cuando los niveles de progesterona que produce son mayores a 1 ng/ml (Thatcher *et al.*, 1989; Gutiérrez, 2006). La mayor parte de la progesterona proviene de las células lúteas grandes (Fields y Fields, 1996; Pate, 1996).

La progesterona es muy importante para llevar a término la gestación, ya que estimula tempranamente al oviducto y al útero a secretar sustancias para nutrir al producto, antes que el embrión lo haga por la placenta (Jenkin y Young, 2004), además suprime la respuesta inmune, cesa las contracciones uterinas, cambia la consistencia del moco cervical y cierra el cérvix (Mihm *et al.*, 2002). La progesterona, participa también en el reconocimiento de la gestación y la retroalimentación negativa de la hormona luteinizante y, finalmente estimula a la glándula mamaria (Mihm *et al.*, 2002).

La hormona luteinizante, es una glicoproteína sintetizada por los gonadotropos del lóbulo anterior de la hipófisis. La LH es importante para que se lleve a cabo la ovulación y posteriormente la formación del cuerpo lúteo (Baird, 1992). Para que la ovulación suceda, se necesita la secreción de LH en forma de pulsos de alta frecuencia y baja amplitud, proporcionando concentraciones altas durante el pico preovulatorio, en cambio durante el diestro y la gestación la forma de secreción de la LH, es en forma de pulsos de baja frecuencia y baja amplitud. La LH estimula a las células lúteas pequeñas, las cuales cuentan con receptores para LH, estimulando la secreción de progesterona, aunque la producción por parte de éstas, es mínima en comparación con las células lúteas grandes (Alila y Hansel, 1984).

Durante la etapa de diestro y la gestación, la secreción de progesterona lútea ejerce retroalimentación negativa en la secreción de LH a dos niveles: a nivel hipotalámico, inhibe la secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y a nivel hipofisiario, disminuye la síntesis de receptores a GnRH, en consecuencia, disminuye la secreción pulsátil de LH. Esto permite pensar, que es posible que la función lútea dependa de hormonas distintas a la LH (Denamur *et al.*, 1966; Baird, 1992).

Se sabe que durante la formación del cuerpo lúteo, además de la LH participan otras hormonas (Senger, 2003). La LH por ejemplo, promueve la formación de receptores para la hormona de crecimiento (GH) y se ha visto que el tratamiento con GH en borregas hipofisectomizadas reestablece la función normal del cuerpo lúteo. Denamur *et al.* (1966) y Kann (1973) demostraron que la aplicación de prolactina por periodos prolongados mantuvo la función del cuerpo lúteo en ovejas hipofisectomizadas e histeroectomizadas, indicando así que la prolactina tiene una acción luteotrópica. Por otro lado, en la rata preñada, está bien estudiado que la prolactina mantiene la secreción de progesterona y estimula en sinergia con el estradiol, la síntesis proteica y la hipertrofia de las células lúteas (Gibori, 1993). Asimismo, en las perras, la prolactina tiene efecto luteotrópico y es esencial para mantener la producción de progesterona por el CL (Kooistra y Okkens, 2002).

El estudio de la dependencia del cuerpo lúteo a otras hormonas se ha hecho en diferentes especies y con diferentes modelos. McNeilly *et al.* (1992), observaron que, en ovejas tratadas en forma aguda con un antagonista de GnRH por tres días se abolió la secreción pulsátil de la LH y no afectó la liberación de progesterona durante la fase lútea.

Anderson *et al.* (1999) mostraron que la preñez pudo mantenerse hasta un término normal en ganado bovino al que se le seccionó el tallo hipofisiario, y en el cual se mantuvieron las concentraciones de prolactina, hormona del crecimiento y lactógenos placentarios mientras que la LH no se detectó.

Luego entonces, la evidencia en otras especies y en rumiantes tratados con agonistas de la secreción de la LH (Gibori, 1993; McNeilly *et al.*, 1992; Anderson *et al.*, 1999), hace suponer que para la vaca, esta hormona no es indispensable para el mantenimiento de la función lútea.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO

2.1. Objetivo

El objetivo de este trabajo fue determinar si el mantenimiento del cuerpo lúteo de la gestación en la vaca depende de la secreción de la LH.

2.2. Hipótesis

La disminución de la secreción pulsátil de LH con un agonista de GnRH, no afecta el mantenimiento del cuerpo lúteo de la vaca gestante.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Ciclo estral

El ciclo estral consiste en una serie de eventos ováricos, endocrinos y conductuales que tienen como fin la ovulación, el apareamiento y finalmente la gestación. Dura de 17 a 25 días en vacas, empieza con el estro y finaliza con la presentación del siguiente estro, esta ciclicidad se interrumpe de manera fisiológica con la preñez y el amamantamiento (Bearden y Fuquay, 2000).

De acuerdo a las estructuras ováricas presentes, el ciclo estral, se divide en dos grandes fases: La folicular, dura aproximadamente el 20% del total del ciclo y en ella ocurre el crecimiento folicular y la receptividad sexual. La hormona que domina es el estradiol. La fase lútea ocupa el 80% del tiempo del ciclo, en ella ocurre la luteinización, el crecimiento y el desarrollo del cuerpo lúteo y finalmente la luteolisis. La hormona que domina esta fase es la progesterona (Einer-Jensen y McCracken, 1981).

Debido a que el estudio se realizó durante la gestación, y que el ambiente hormonal durante la misma es parecido a la fase lútea, ésta, se describe a continuación.

3.1.1. Endocrinología de la fase lútea

La ovulación ocurre entre las 24 y 30 horas de iniciado el estro, las células del folículo se transforman en células lúteas formando el cuerpo lúteo (Richards, 1998). Se considera que el cuerpo lúteo es maduro cuando las concentraciones sanguíneas de progesterona son mayores a 1 ng/mL (Thatcher *et al.*, 1989). Durante el diestro las altas concentraciones de progesterona inhiben la liberación de FSH y LH a través de una retroalimentación negativa sobre el GnRH producido por el hipotálamo y sobre la LH producida en la hipófisis, disminuyendo con esto la manifestación de celo. En la fase lútea se presentan pequeños incrementos en los niveles séricos de FSH y estrógenos, los cuales favorecen las oleadas foliculares (Campbell *et al.*, 2003). La frecuencia en la pulsatilidad de GnRH/LH es de un pico cada 2-4 horas al principio de la fase lútea, uno cada 4-6 horas a la mitad y uno cada 8-12 horas al final de la fase lútea (Chabbert-Buffet *et al.*, 2000). Aun así los pulsos existentes de LH en esta fase favorecen la función del cuerpo lúteo y el crecimiento de un folículo dominante (Bearden y Fuquay, 2000). Esta fase culmina con la luteolisis llevada a cabo por la prostaglandina $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) (Acosta y Miyamoto, 2004).

3.1.2. Ovulación

La ovulación es un proceso donde el fin, es la expulsión del ovocito hacia cavidad peritoneal cerca del infundíbulo (Acosta *et al.*, 2003). Para que se lleve a cabo la ovulación, se necesita la intervención de varios mecanismos como las contracciones de las fibras que rodean al folículo y la presión interna del fluido folicular (Hafez, 2002). Cuando la maduración tanto del folículo como del ovocito se ha completado (Bearden y Fuquay, 2000) y han adquirido una adecuada concentración de receptores a LH (Espey y Lipner, 1994) el pico preovulatorio de LH inicia una cascada de eventos que conllevan a la ovulación 24 a 25 horas más tarde (Bearden y Fuquay, 2000). Se ha visto que también aumentan los niveles de ácido ribonucleico mensajero (RNAm) que codifica el receptor a progesterona dentro de las 6 horas después del pico de LH, mismos que contribuyen a la ruptura del folículo (Cassar *et al.*, 2002). Después del pico preovulatorio, la concentración de progesterona aumenta inmediatamente en el folículo, la progesterona estimula la síntesis de colagenasa por parte de las células de la teca interna (Richards *et al.*, 1998), unas horas más tarde hay incrementos de estradiol y prostaglandinas (Bearden y Fuquay, 2000). El colágeno, sustrato de la colagenasa, es el mayor componente del tejido conectivo que forma parte de la túnica albugínea y envuelve al ovario (Senger, 2003). Así mismo, hay un flujo local de sangre elevado controlado por la prostaglandina E2 y la histamina, por lo cual las células de la teca interna empiezan a edematizarse por un aumento en la permeabilidad vascular. Esta condición aumenta la presión hidrostática alrededor del folículo, aunado a esto, los folículos dominantes empiezan a producir factores angiogénicos (Senger, 2003).

La PGF₂ α favorece a la ruptura de vesículas localizadas fuera del folículo, entre la superficie epitelial y la túnica albugínea que contienen en su interior enzimas proteolíticas (Senger, 2003). Las enzimas proteolíticas de las vesículas causan una degeneración de la túnica albugínea, la teca externa y la teca interna, mientras que la prostaglandina E2 actúa sobre la plasmina, enzima proteolítica encontrada en el líquido folicular y que actúa en la membrana basal. Las paredes del folículo comienzan adelgazarse, apareciendo un estigma, que es el punto donde se rompe posteriormente para liberar al ovocito (Bearden y Fuquay, 2000). Pero también actúan generando contracciones en el ovario, incrementando la presión local y forzando a que el estigma protuya (Senger, 2003). Las contracciones van incrementándose conforme se acerca la ovulación (Bearden y Fuquay, 2000). Es así, como la interacción del pico preovulatorio de LH y los factores locales del ovario, facilitan la ruptura del folículo terciario resultando en la expulsión del ovocito y el desarrollo subsecuente del CL (Acosta y Miyamoto, 2004).

3.1.3. Luteinización

La luteinización comienza antes de la ovulación, a partir del pico preovulatorio de LH, y consiste en cambios morfológicos, endocrinos y enzimáticos del folículo hasta convertirse en un cuerpo lúteo (Espey y Lipner, 1994). Estos cambios son dramáticos, pues de ser una entidad que produce estrógeno, se vuelve en una que produce progesterona (Senger, 2003).

Con la luteinización, ocurre una reorganización y remodelación del folículo y tejido adyacente conforme las células de la granulosa y de la teca se luteinizan (Richards *et al.*, 1998). La capa de células de la granulosa se disocia sólo en la porción apical y finalmente desaparece, mientras que las células de la teca pierden cohesión por el aumento de líquido folicular que ocasiona un edema local, y por la destrucción de las fibras de colágeno de la membrana basal (Acosta *et al.*, 2003).

Las células de la teca interna se multiplican (hiperplasia) y diferencian en células lúteas chicas, mientras que las células de la granulosa se hipertrofian pero no se multiplican, dando lugar a un número de células lúteas grandes (Arosh *et al.*, 2004). Además comienza la formación de una amplia red de capilares que constituyen el 20% del cuerpo lúteo maduro (Senger, 2003; Arosh *et al.*, 2004). Esta red de capilares, está bajo el control de mediadores angiogénicos, como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) que estimula la proliferación de células endoteliales por acción de la LH, sobre todo en la etapa inicial del desarrollo del CL, y el factor de crecimiento endoteliovascular (VEGF) que promueve la invasión de las células endoteliales a la capa de células de la granulosa y la organización y mantenimiento de la microvasculatura del CL (Galina, 2006).

Poco antes de la ovulación, la membrana basal del folículo sufre una parcial desintegración y la separación física de las células de la teca y la granulosa desaparece (Senger, 2003). Inmediatamente después de la ovulación, las paredes del folículo se colapsan dentro de muchos dobleces. Estos dobleces empiezan a interdigitarze, permitiendo que las células tecales y las de la granulosa se mezclen, entonces forman una glándula consistente en células de tejido conectivo, células de la teca y granulosa. En general, las células de la teca y la granulosa originales se mezclan uniformemente con otras (Senger, 2003).

Las células lúteas grandes, varían en diámetro y van desde los 20 a 40 μm dependiendo de la especie (Alila y Hansel, 1984). Las células lúteas grandes de las vacas, contienen un gran número de gránulos de secreción densos en el citoplasma (Alila y Hansel, 1984; Farin, 1986). Estos

gránulos, contienen oxitocina en el cuerpo lúteo del ciclo estral y se cree que contienen relaxina en el cuerpo lúteo de la preñez (Senger, 2003). Los gránulos son independientes del estímulo de la LH (Alila y Hansel, 1984). Las células lúteas pequeñas tienen menos de 20 μm de diámetro, tienen una forma irregular y poseen numerosos gránulos lipídicos en su citoplasma. Las células lúteas pequeñas no contienen gránulos secretores (Alila y Hansel, 1984), y son 6 veces más responsivas al estímulo de LH (Alila y Hansel, 1984). Ambos tipos celulares son esteroidogénicos, es decir, producen progesterona (Fitz *et al.*, 1982).

3.1.4. Luteolisis

La luteolisis es un proceso que se presenta en forma funcional y estructural en el cuerpo lúteo (Arosh *et al.*, 2004) causada por la secreción pulsátil de prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) uterina, la cual actúa localmente en el cuerpo lúteo por un mecanismo de contracorriente, entre la vena uterina y la arteria ovárica (McCracken *et al.*, 1999; Niswender, 2006).

Lo primero que ocurre, es una pérdida en la capacidad de sintetizar y secretar progesterona por parte del CL (McCracken *et al.*, 1999; Niswender, 2006). Posteriormente, hay una serie de cambios en el sistema vascular lúteo, como son la hipertrofia y la hiperplasia de las células de la pared de los vasos sanguíneos, la acumulación de fibras elásticas en la media, la degeneración mucoide de la íntima, la protrusión de algunas células endoteliales dentro del lumen lo cual resulta en la disminución en el diámetro vascular, y en la disminución del flujo sanguíneo al cuerpo lúteo (Acosta *et al.*, 2002).

El patrón episódico de la secreción de prostaglandina parece ser controlado indirectamente por las hormonas esteroides ováricas 17β estradiol y progesterona, al final de la fase lútea, la pérdida de acción de la progesterona ocurre tanto en el hipotálamo como en el útero debido a una reducción catalítica (regulación a la baja) de los receptores a progesterona, lo cual permite a los estrógenos, liberados del folículo, actuar de nuevo en el hipotálamo y el útero, causando pulsos generadores de oxitocina hipotalámica, alterando su frecuencia (McCracken *et al.*, 1999; Niswender *et al.*, 2000). Los receptores a oxitocina en el endometrio provocan la secreción de pulsos luteolíticos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ del útero, aunque son bajos los niveles de esta hormona, son suficientes para que el cuerpo lúteo libere oxitocina, ya que está altamente sensibilizado (McCracken *et al.*, 1999). Comenzando así, una retroalimentación positiva entre oxitocina y $\text{PGF}_{2\alpha}$ provenientes del CL y el útero,

respectivamente (Niswender *et al.*, 2000). Es importante mencionar, que si se practica la histerectomía en la vaca, la vida del CL se prolonga (Arosh *et al.*, 2004).

Una de las principales acciones de la $\text{PGF}_2\alpha$ es la disminución del flujo sanguíneo hacia el cuerpo lúteo, provocando una disminución de nutrientes y de sustratos para la esteroidogénesis además del soporte luteotrópico (Acosta *et al.*, 2003; Schams y Berisha, 2004). Al disminuir el flujo sanguíneo, hay degeneración de las células endoteliales, generando una disminución en la densidad capilar (Niswender *et al.*, 2000).

Por otro lado la endotelina -1 (ET-1) parece estar mediando la acción de la prostaglandina, ya que durante la luteólisis se eleva la concentración de ésta (Girsh *et al.*, 1996). La endotelina es un péptido y potente vasoconstrictor y tiene un amplio espectro biológico de actividades en diferentes tejidos, en lo que al tema concierne, interviene en el flujo sanguíneo al igual que la angiotensina II. La endotelina inhibe la producción de progesterona de las células lúteas dispersas bovinas, activando vía de sitios unidores con alta afinidad a la ET-1 presente en las células esteroideogénicas. La $\text{PGF}_2\alpha$ inhibe la producción de progesterona y eleva a la ET-1 induciendo un efecto antiesteroideogénico (Girsh *et al.*, 1996). La ET-1 y la angiotensina II actúan como agentes vasoconstrictores, e incluso inducen apoptosis (Niswender *et al.*, 2000; Schams y Berisha, 2004).

La $\text{PGF}_2\alpha$ actúa en los receptores ubicados en las células lúteas grandes (Fitz *et al.*, 1982). El receptor es del tipo receptor unido a proteína G, el cual activa a la fosfolipasa C, enzima que induce la liberación de calcio (Ca). Las altas concentraciones de Ca intracelular activan a la proteincinasa C (Berridge y Irvine, 1989) ocasionando una modificación en la síntesis de las proteínas para la esteroidogénesis, en la disponibilidad de colesterol y en el mantenimiento de la matriz extracelular (Wiltbank *et al.*, 1992, McCracken *et al.*, 1999).

La $\text{PGF}_2\alpha$ afecta el transporte intracelular de colesterol y la síntesis de progesterona (Murdoch *et al.*, 1996). Es decir, actúa sobre citocromo P-450 scc, la cual se encuentra en la membrana interna de la mitocondria y se encarga de convertir al colesterol en pregnenolona; paso importante para la esteroideogénesis (McCracken *et al.*, 1999). También ocasiona una disminución en la concentración de la proteína StAR (proteína reguladora esteroidogénica aguda), que facilita el transporte de colesterol a través de la membrana mitocondrial para proveer el sustrato a la P-450 scc (Pescador *et*

al., 1996; McCracken *et al.*, 1999). Este mecanismo de inhibición parece ser el principal para disminuir la síntesis de progesterona (Niswender *et al.*, 2000).

Por otro lado, el sistema inmune se ve implicado en la luteolisis, ya que existe infiltración de células inflamatorias como son linfocitos T y macrófagos. La principal función de los macrófagos es la de fagocitar las células lúteas en degeneración y la degradación de la matriz extracelular (Niswender *et al.*, 2000). Los macrófagos y linfocitos liberan citocinas pro-inflamatorias, mediadores intercelulares como el interferón gamma ($IFN\gamma$), interleucina 1β ($IL-1\beta$) y factor de necrosis tumoral α ($TNF\alpha$) (Davis *et al.*, 1996). Las citocinas, a su vez, estimulan la liberación de $PGF_2\alpha$ por parte del CL, además el $TNF\alpha$ es capaz de inhibir la secreción de progesterona inducida por LH, *in vitro* (Fairchild y Pate, 1992). La combinación de $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$ tiene un efecto altamente citotóxico (Fairchild y Pate, 1992; Davis *et al.*, 1996). Por tanto, se considera que las citocinas pueden estar involucradas en la luteólisis, ya que favorecen la inducción de apoptosis en el tejido lúteo (Senger, 2003).

3.2. Gestación

La gestación en la vaca dura aproximadamente 282 días (Galina, 2006), para que la preñez se establezca es necesaria la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo (Baird, 1992; Anderson *et al.*, 1999).

3.2.1. Reconocimiento materno de la gestación

El reconocimiento materno es necesario, ya que evita la luteolisis (Ezashi y Roberts, 2004). Sucede entre el día 10 y 21, llegando a su pico entre el día 14 y 16 con la producción de interferón- tau ($IFN-\tau$) por parte del embrión (Bazer *et al.*, 1994). El $IFN-\tau$ se une a sus receptores en las células del endometrio, desencadenando la inhibición de la expresión de receptores a estrógenos y oxitocina (Bazer *et al.*, 1994; Ezashi y Roberts, 2004). Por lo que, al no ejercer estímulo la oxitocina y los estrógenos provenientes de los folículos en desarrollo en el endometrio, éste no secreta prostaglandinas que puedan destruir al cuerpo lúteo (Abel *et al.*, 1980).

3.2.2. Placenta

La placenta es un órgano endocrino temporal, que produce el 20% del total de progesterona necesaria para la gestación, además produce también hormona del crecimiento y prolactina (Gootwine, 2004).

3.2.3. Endocrinología de la gestación

El cuerpo lúteo es la principal fuente de progesterona, ya que produce cerca del 80 % en la vaca gestante, el otro 20 % es sintetizado por la placenta y otras fuentes como las células binucleadas. Es importante la progesterona, ya que protege del rechazo inmunológico y controla la contractibilidad uterina induciendo un ambiente adecuado para el desarrollo fetal (Schindler, 2005).

Los folículos en crecimiento secretan estrógenos a lo largo de la gestación, su concentración tiene variaciones conforme va avanzando la gestación. Los estrógenos son necesarios para el transporte de gametos (Galina, 2006).

Las células gigantes binucleadas, secretan lactógenos placentarios. También son importantes sitios de esteroidogénesis produciendo progesterona y estrógenos (Lee y DeMayo, 2004).

El principal estrógeno en la gestación, es el 17β estradiol, producido principalmente por la placenta. Los estrógenos son prerequisites para la acción de otras hormonas, como la progesterona; además tienen acción en útero, y otra acción menos específica es con respecto al desarrollo embrionario, pues ayuda a satisfacer las demandas energéticas en aumento (Galina, 2006).

En la gestación, es cuando hay mas porcentaje de atresia folicular, ya que si es bien cierto que la presencia del producto favorece el desarrollo folicular, también es cierto que este crecimiento es limitado, sufriendo atresia todos los folículos que se encontraban en crecimiento. Finalmente, el cuerpo lúteo produce relaxina, hormona que aumentará su concentración en sangre, conforme se acerque el parto y ayudará en las modificaciones que sufren las estructuras óseas y cartilagosas al momento del parto (Galina, 2006).

3.3. Cuerpo Lúteo

El cuerpo lúteo (CL), es una glándula transitoria resultante de un folículo que ya ovuló (Arosh *et al.*, 2004). Por medio de la luteinización, proceso que como ya se mencionó en el primer capítulo, comienza aún antes de la ovulación con el pico preovulatorio de LH y en el cual las células de la teca se multiplican y se convierten en células chicas, y las de la granulosa sufren hipertrofia convirtiéndose en células lúteas grandes, ambas con capacidad esteroidogénica. Así, el CL maduro produce cantidades suficientes de progesterona y se mantendrá durante la fase lútea o la gestación (Fields y Fields, 1996).

Después de la ovulación, el CL recién formado incrementa su tamaño y la secreción de progesterona, la cual es dependiente de los procesos angiogénicos (Acosta *et al.*, 2002). El desarrollo del CL, es caracterizado por una alta vascularización y repetidas mitosis de las células esteroideogénicas. El cuerpo lúteo es de los órganos más vascularizados y el que recibe la mayor tasa de flujo sanguíneo por unidad de tejido, este sistema vascular provee nutrientes a las células lúteas y hormonas circulantes para sostener la producción de progesterona (Acosta *et al.*, 2002). La intensidad del proceso angiogénico alcanza su pico a los 2-3 días después de la ovulación (Acosta y Miyamoto, 2004). Las concentraciones de progesterona por otro lado, tienen que ver con la vida y la función del cuerpo lúteo y por lo tanto de la gestación (Ginther, 2000; Arosh *et al.*, 2004).

3.3.1. Control endocrino de la formación y función del cuerpo lúteo

La LH, la GH, así como los factores de crecimiento, péptidos, esteroides y prostaglandinas son importantes moduladores de la formación y función lútea. Durante el desarrollo temprano del CL, hasta la mitad, la oxitocina, las prostaglandinas y la progesterona estimulan la proliferación celular y la función es soportada por la acción luteotrópica de un número de factores de crecimiento. La alta expresión de RNAm, la concentración proteica, y la localización de factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos 1 y 2 (FGF-1, FGF-2), el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGFs), en el citoplasma de las células lúteas durante la mitad del desarrollo, sugieren funciones de mantenimiento (Schams y Berisha, 2004). Pero también la GH, IGF-1 e IGF-2 estimulan la secreción de progesterona (Neuvians, *et al.*, 2003).

La LH y el IGF-1 son potentes estimuladores de la expresión del RNAm del VEGF y de la secreción del VEGF en las células de la granulosa. El FGF₂ está presente al comienzo y al final de la fase lútea, el FGF1 está presente a la mitad. La IGF-1 puede tener efectos directos e indirectos en la angiogénesis por acción estimulante de la producción de VEGF en las células lúteas así como la proliferación y diferenciación de células endoteliales. La localización en los pericitos sugiere efectos directos en la estabilización capilar. Las hormonas primarias luteotrópicas son LH y GH que apoyan el desarrollo y la función del CL. La principal hormona que estimula la producción de progesterona por parte de las células lúteas pequeñas es la LH, la mayoría de sus receptores están en estas células, el mecanismo por el cual la LH estimula la secreción de progesterona involucra la formación de AMPc, la activación de PKA y el subsecuente incremento en la producción de progesterona. Los factores angiogénicos no sólo regulan la angiogénesis también estimulan la

función del cuerpo lúteo, estimulando la secreción de progesterona, oxitocina, IGF-1 e IGF-2 (Schams y Berisha, 2004).

3.3.2. Células lúteas no esteroideogénicas

Dependiendo de su acción, hay dos tipos celulares en el cuerpo lúteo, las células lúteas no esteroideogénicas y las esteroideogénicas. Las primeras incluyen a los macrófagos y células endoteliales que se originan y migran desde el sistema microvascular. Estas células juntas ocupan alrededor del 53% de la masa del CL maduro. Los macrófagos tienen actividad fagocitaria participando en la respuesta inmune y están involucrados en la regresión del CL (Fields y Fields, 1996) ya que se ha observado su migración al comienzo de la luteólisis (Bauer *et al.*, 2001). Las células endoteliales se encuentran en el lumen de los vasos y secretan factores que pueden estar involucrados tanto en los procesos luteotrópicos como en los luteolíticos. Los fibroblastos son componentes estructurales y producen glicosaminoglicano y colágeno, también se ha visto que producen citocinas al igual que las células endoteliales (Fields y Fields, 1996; Bauer *et al.*, 2001).

3.3.3. Células lúteas esteroideogénicas

Hay dos tipos celulares, las células lúteas pequeñas y las células lúteas grandes. Juntas representan alrededor del 70% del volumen del CL, las pequeñas miden < 23 μm de diámetro y representan el 26% de las células lúteas (28% de la masa del CL) produciendo niveles basales muy bajos de progesterona, pero al ser estimuladas por la LH, aumentan su producción. Las grandes miden 24-45 μm de diámetro representan el 3% de las células lúteas (40% de la masa del CL), estas no responden a la LH, en cambio se ha visto que son más responsivas a la prostaglandina además secretan oxitocina y son responsables de la mayor secreción basal de progesterona (Fields y Fields, 1996; Pate, 1996).

Cabe mencionar que las diferencias funcionales entre estos dos grupos no son tan evidentes en el CL de gestación, debido tal vez a que provengan de una misma célula progenitora. Alila y Hansel (1984) demostraron que al principio y hasta la mitad del ciclo estral las células pequeñas provienen de la teca y las grandes de la granulosa, no siendo así al final del ciclo, así como en la gestación, donde encontraron células grandes provenientes de la teca. Esto en términos de comunicación celular podría ser importante ya que Del Vecchio *et al.* en 1994, observaron que las células pequeñas inhibían la producción de progesterona por parte de las células grandes. Pero también se

ha visto que la síntesis de progesterona aumenta si los dos tipos celulares establecen contacto, aunque la naturaleza de las interacciones no está clara (Pate, 1996).

3.3.4. Comunicación celular

La comunicación intercelular es muy importante para que haya una buena función lútea. Muchas de las sustancias a las cuales responden las células lúteas tales como las prostaglandinas, los factores de crecimiento, la oxitocina y la progesterona son producidas localmente (Acosta y Miyamoto, 2004). Estas pueden actuar como factores parácrinos para modular la respuesta de las células lúteas a señales hormonales. Las células endoteliales, por ejemplo, producen factores que pueden modificar la esteroidogénesis, así mismo la proliferación de éstas es un estímulo necesario para la formación de nuevos vasos. La comunicación que ocurre entre células lúteas y células inmunes es importante, pues estas últimas producen citocinas que pueden modificar la síntesis de progesterona y prostaglandina por parte de las células lúteas (Pate, 1996; Acosta y Miyamoto, 2004).

Las citocinas pueden tener también efectos citotóxicos directos en las células lúteas, y las células muertas son fagocitadas por macrófagos residentes. Los factores secretados por las células lúteas pueden servir como quimiotácticos para las células inmunes, y pueden estimular o suprimir las funciones de las células inmunes. Es así como la comunicación dentro del cuerpo lúteo es muy compleja (Pate, 1996).

La comunicación puede ocurrir de dos maneras. Pueden ser transmitidas directamente entre célula y célula transmitiendo sus contenidos, a través de una molécula que funcione como mensajero intracelular, que puede amplificar al mismo tiempo la señal inicial. El otro tipo de comunicación es secretando productos. Estas señales pueden estar influenciando a muchas células vecinas simultáneamente (Pate, 1996).

3.3.5. Otras sustancias

También son de importancia para la función del cuerpo lúteo, la angiotensina II, la endotelina I y el péptido atrial natriurético (ANP), que son péptidos vasoactivos moduladores del tono vascular en la circulación sistémica. Se ha visto que estos péptidos modifican la síntesis y secreción de hormonas producidas en las células ováricas en una manera autocrina/paracrina.

El crecimiento de capilares nuevos soporta el desarrollo de células lúteas y es localmente potencializado por la angiotensina II y los factores de crecimiento que inducen la angiogénesis y ayudan a la síntesis de progesterona por parte de las células lúteas. En estudios realizados con un sistema de microdiálisis (MDA) tanto *in vitro* como *in vivo* se ha observado que la producción local de prostaglandinas y angiotensina II es alta dentro del recién formado cuerpo lúteo, y que la $PGF_2\alpha$ y la angiotensina interactúan y potencializan la capacidad de las células lúteas para producir progesterona. Así también se ha demostrado que los factores de crecimiento angiogénico tales como el factor de crecimiento de fibroblastos básico y los factores de crecimiento de endotelio vascular estimulan a la angiotensina II, la $PGF_2\alpha$ y la secreción de progesterona. Además, la angiotensina II y la oxitocina también estimulan la secreción de $PGF_2\alpha$, y la angiotensina junto con la $PGF_2\alpha$ estimulan muy fuertemente la secreción de progesterona (Acosta y Miyamoto, 2004).

3.3.6. Cuerpo lúteo de la gestación

El cuerpo lúteo de la gestación, es una estructura más ancha que un cuerpo lúteo del ciclo estral (Galina, 2006). La composición de células lúteas pequeñas y grandes en un cuerpo lúteo al principio de la gestación, es similar a un cuerpo lúteo a la mitad de la fase lútea del ciclo estral. Las células lúteas grandes producen 13 veces más progesterona por célula que las células lúteas pequeñas, pero las últimas responden a la estimulación de LH pues tienen más receptores a esta hormona. Anteriormente, se había establecido que las células lúteas pequeñas provienen de las células tecales y por su parte, las células lúteas grandes provienen de las células de la granulosa, pero por estudios realizados en cuerpos lúteos de diferentes días de gestación, se ha observado que conforme va avanzando la gestación, la proporción de células y su capacidad esteroideogénica va cambiando, es decir va aumentando la cantidad de células lúteas grandes, por lo que se concluye que hay dos subpoblaciones de células lúteas grandes, las que proviene de la granulosa y las que provienen de la teca (Arikan y Yigit, 2001).

En cuanto a los receptores para LH, se ha encontrado que existe la misma concentración de receptores tanto en cuerpos lúteos de vacas gestantes como en cuerpos lúteos de vacas que se encuentran en la mitad de la fase lútea (Okuda *et al.*, 1999).

3.4. Hormona Luteinizante

La hormona luteinizante pertenece a la familia de glicoproteínas, las cuales están compuestas por dos distintas subunidades glicosiladas unidas por uniones no covalentes. Presenta una subunidad α

común, y una subunidad específica, la β . Cada subunidad es expresada dentro de un gonadotropo, aunque hay gonadotropos mono y bihormonales que coexisten. Una molécula de LH funcional, se acaba de formar durante la migración hacia el aparato de Golgi, para después ser almacenada en los gránulos (Counis *et al.*, 2005).

Se cree, que la LH es esencial para la secreción de cantidades normales de progesterona. La LH interactúa con los receptores, cuya concentración y número incrementan desde la ovulación hasta alcanzar un máximo a la mitad de la fase lútea, para posteriormente disminuir hacia el final de la fase lútea (Baird, 1992).

3.4.1. Patrón de secreción de LH

Desde que se desarrollaron los modelos ovinos, para muestrear sangre hipofisiaria y sangre periférica simultáneamente para la medición de GnRH y LH respectivamente, se observó con claridad el patrón pulsátil de la secreción de LH. Este sistema permite la amplificación de la señal, ya que la GnRH secretada en picogramos en la sangre portal estimula pulsos de LH en sangre periférica en un rango de nanogramos. El patrón fásico de secreción de GnRH y LH permite la modulación tanto de frecuencia como de amplitud. La liberación de LH se induce por la liberación de GnRH almacenada, con una pequeña relación entre la cantidad de LH plasmática (Clarke y Pompolo, 2005). En estudios en borregas se ha confirmado que la LH se almacena en gránulos electrodensos dentro de los gonadotropos asociados con la proteína secretogranina II, la cual es esencial para inducir la secreción pulsátil de LH. La asociación ocurre en condiciones de bajo pH y altas concentraciones de calcio. Los gránulos parecen polarizar la membrana celular en un 20% pero esta cantidad aumenta durante el pico preovulatorio de LH, tal vez inducido por los altos niveles de estradiol (Pawson y McNeilly, 2005). Pero hay gránulos menos electrodensos que sólo contienen LH y parecen liberarla de una manera constitutiva en ratas aunque todavía no está bien claro (Crawford *et al.*, 2002 citado por Pawson y McNeilly, 2005).

Se ha visto *in vivo* que durante la fase lútea la LH se secreta una vez cada hora en el día 1, en cambio, hay un pulso cada 4 a 6 horas en el día 12 (Baird, 1992).

Si retiramos LH al principio de la fase lútea, la secreción de progesterona es mucho menor. En contraste si retiramos LH a mediados o a finales de la fase lútea, la secreción de progesterona cesa y el útero comienza a secretar cantidades cada vez mayores de PFG2 α que alcanzan al cuerpo lúteo y las cuales interfieren con la unión de LH al sistema adenilciclase. Además, el cuerpo lúteo es

susceptible a la acción de $PGF_2\alpha$ durante los largos periodos entre pulso y pulso de LH. Cuando ocurre un pico de LH, hay incremento temporal en la secreción de progesterona debido a la concentración de AMPc intracelular, pero eventualmente la secreción de $PGF_2\alpha$ es suficiente para que la LH no se una a su receptor y posteriormente ocurre la regresión lútea (Baird, 1992).

3.5. Progesterona

La progesterona es una hormona esteroide, secretada por el cuerpo lúteo bajo el control de la LH. Se ha visto que, al segundo día después de la ovulación las concentraciones de progesterona en sangre se elevan, llegándose a detectar concentraciones mayores a 1 ng/mL al quinto día, es así como el CL adquiere su plena funcionalidad (Thatcher *et al.*, 1989). Siendo la progesterona el principal producto de secreción del CL, esta hormona es crucial para el mantenimiento de la gestación (Anderson *et al.*, 1999; Jenkin y Young, 2004), asimismo, es de importancia en mecanismos como el de preparar al útero para el reconocimiento de la gestación, y el control de la retroalimentación negativa de la secreción de LH (Inskeep, 2004). La progesterona, es responsable de estimular la secreción de sustancias en la mucosa del oviducto y el útero, mismas que nutrirán al producto hasta que pueda hacerlo a través de la placenta (Thatcher *et al.*, 1989); suprime asimismo, la respuesta inmune del útero, lo cual es necesario para evitar el rechazo del embrión, evita las contracciones del útero, cierra el cérvix y modifica las características del moco cervical, volviéndolo más viscoso, evitando el paso de agentes extraños al interior del útero, manteniendo al producto protegido contra agentes externos (Spencer *et al.*, 2004).

El mecanismo de acción de la progesterona, es disminuyendo la frecuencia en la pulsatilidad sin afectar la amplitud de GnRH/LH, pero bajo la influencia de estradiol (Chabbert-Buffet *et al.*, 2000).

Ahora bien, la progesterona, tiene un efecto en la funcionalidad del cuerpo lúteo de una manera autócrina y parácrina, ya que estimula la secreción de $PGF_2\alpha$ lútea, pero inhibe la secreción de $PGF_2\alpha$ uterina. Cabe señalar que las $PGF_2\alpha$ producidas localmente en cuerpo lúteo son luteotrópicas a diferencia con las endometriales (Schams y Berisha, 2004).

El mecanismo de acción de la progesterona se da de dos maneras: la genómica y la no genómica. La genómica implica la unión de la hormona con su receptor nuclear y la activación de transcripción de genes teniendo una duración de muchas horas o días. La no genómica, involucra interacciones de esteroides con canales iónicos o receptores neurotransmisores, por ejemplo la

progesterona se puede unir directamente al receptor de oxitocina e inhibir su función en el útero de la rata, aunque estos efectos son rápidos, alrededor de 45 minutos, puede activarse también un proceso de transcripción (Chabbert-Buffet *et al.*, 2000).

3.5.1. Control agudo de la secreción de progesterona

El control agudo, son todos los procesos y hormonas implicadas en el transporte de colesterol al interior de la mitocondria (sitio primario de este tipo de regulación), ya que es una limitante para la biosíntesis de la progesterona (Niswender, 2002). Tanto las hormonas luteotrópicas (LH, GH, prolactina, etc), como las luteolíticas (PGF_{2α}) regulan las concentraciones de RNAm que codifican receptores, transporte de proteínas y enzimas esteroidogénicas. Por otro lado hay por lo menos tres proteínas esenciales en el transporte del colesterol. La STAR, el receptor periférico tipo benzodiazepina (PBR) y la endozepina, el cual es el ligando natural del PBR (Niswender, 2002). La progesterona puede controlar su propia producción a través de un mecanismo autocrino a nivel de sus receptores ya que mientras los estrógenos regulan a la alta, la progesterona regula a la baja sus propios receptores (Anderson *et al.*, 1999; Chabbert-Buffet *et al.*, 2000). Existen otras sustancias como los leucocitos que se han visto implicados directa o indirectamente con la producción de progesterona (Bauer *et al.*, 2001).

3.5.2. Control crónico de la secreción de progesterona

El control crónico de la secreción, está dado por la LH. La estimulación de la LH es crítica para la capacidad esteroidogénica a largo plazo de las células lúteas, incluyendo el mantenimiento de cantidades normales de RNAm que codifican a la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, a la citocromo P450_{scc} y a la STAR. La PGF_{2α} causa un descenso marcado en la secreción de progesterona, y está mediada por el sistema proteincinasa C, además que tiene efectos moleculares que incluyen un descenso en las concentraciones lúteas de RNAm que codifican al receptor de LH y reduce el flujo sanguíneo ovárico y lúteo, induce fragmentación del DNA y la apoptosis resultando en muerte celular, lo cual parece ser por un aumento de calcio intracelular (Niswender, 2002).

3.5.3. Fuentes extraordinarias de progesterona

Las glándulas adrenales maternas, las gónadas fetales y las glándulas adrenales fetales producen progesterona aunque en una cantidad muy reducida (Anderson *et al.*, 1999).

3.6. Otras hormonas que participan en la formación y mantenimiento del cuerpo lúteo

3.6.1. Hormona del crecimiento

La hormona del crecimiento (GH) al igual que la prolactina es producida por el lóbulo anterior de la hipófisis, y como hormona metabólica promueve el crecimiento y la lactogénesis (Lucy, 1995), teniendo también acción en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Chandrashekar *et al.*, 2004). La GH tiene receptores en el cuerpo lúteo, pero sólo en las células lúteas grandes, estimulando su función ya que incrementa las concentraciones de progesterona. Si se administra hormona del crecimiento recombinante bovina incrementa el peso del cuerpo lúteo (Lucy, 1995).

La administración de la GH *in vivo* incrementa la síntesis hepática de IGF-I, la cual incrementa la secreción de progesterona en el cuerpo lúteo (Yuan y Lucy, 1996), en cambio se ha visto, en la hembra gestante de ratón, que la ausencia de GH, disminuye la capacidad para formarse un CL funcional (Chandrashekar *et al.*, 2004).

Anderson *et al.* (1999) encontraron que la GH junto con la prolactina, mantuvieron la secreción de progesterona en vaquillas a las que se les seccionó el tallo hipofisiario. La prolactina se comportó de igual manera en los animales testigo, mientras que la LH, disminuyó abruptamente a niveles no detectables, sugiriendo con estos resultados, que la prolactina, la GH y posiblemente los lactógenos placentarios son luteotrópicos durante la preñez en las vaquillas.

3.6.2. Prolactina

La prolactina es una hormona proteica de 199 aminoácidos que se produce en la hipófisis anterior, por unas células llamadas lactotropos, aunque también se produce en todo el cuerpo como es el caso del endometrio, células de la granulosa, células embrionarias y linfocitos. Su liberación es estimulada principalmente por la hormona liberadora de tirotrópina y controlada principalmente por la dopamina. Es muy parecida a la hormona del crecimiento, ya que comparten un gen ancestral y un factor de transcripción llamado PIT-1 (Lebedeva *et al.*, 1998; Perks *et al.*, 2003).

Los trabajos más extensos que se han hecho de prolactina, han sido encaminados hacia roedores. Así, se ha demostrado, que la prolactina participa en el rescate y funcionamiento del cuerpo lúteo durante la preñez (Chandrashekar *et al.*, 2004), así como en el desarrollo de la glándula mamaria y la modulación de la conducta y la función inmune, importantes durante la preñez. La prolactina

también aumenta la esteroidogénesis en la gónada y promueven la síntesis de receptores a LH (Schuler *et al.*, 1997).

La prolactina, juega un papel importante en hamsters ya que se ha visto que su retiro causa una luteólisis funcional, al disminuir los niveles séricos de progesterona, así como también luteolisis estructural al sufrir apoptosis las células lúteas. Es así como se demuestra que la prolactina regula los niveles de progesterona en suero y facilita el desarrollo de vasos lúteos en esta especie (Chen *et al.*, 2002).

Además la prolactina previene el catabolismo de la progesterona, inactivando a la enzima 20α HSD a lo largo de la gestación ya que, al final de la misma se observa un incremento la enzima y un descenso abrupto en los niveles séricos de progesterona, con el subsecuente parto (Frasor y Gibori, 2003). También en el cerdo la prolactina incrementa la secreción de progesterona por parte de las células lúteas grandes, y a la mitad de la gestación los receptores a esta hormona aumentan considerablemente (Yuan y Lucy, 1996). En borregas hipofisectomizadas, se observó la importancia de la prolactina, ya que si bien es cierto que la LH es importante para la secreción de progesterona, si se administraba simultáneamente se mantenía la integridad estructural del CL (Baird, 1992).

En la mujer se ha reportado la presencia de receptores para prolactina en el ovario, aunque todavía no se determina si es producida localmente, y se piensa que tiene participación en la ovulación y como agente anti-apoptótico (Perks *et al.*, 2003).

3.6.3. Factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-I)

El IGF-I se produce en el hígado jugando un papel importante en el control paracrino de la función de diferentes tipos de células somáticas en el ovario y el testículo. Si bien es cierto que para alcanzar la pubertad se requiere de hormona de crecimiento, también lo es, que para madurar a una edad adecuada y alcanzar el máximo potencial reproductivo se requiere la acción sinérgica de GH y niveles adecuados de IGF-I (Chandrashekar *et al.*, 2004). El IGF-I interactúa sinérgicamente con FSH y LH para regular la proliferación y diferenciación de células de la granulosa y de la teca (Armstrong *et al.*, 2002) además incrementa la producción de progesterona por parte de las células lúteas grandes y muestra un efecto sinérgico con la hormona del crecimiento o la prolactina en la esteroidogénesis en dichas células (Webb *et al.*, 2002). Esto se ha reportado en cerdas, vacas y ratas, por lo cual podemos deducir que mientras la LH estimula la producción de progesterona de las células lúteas pequeñas, el factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I incrementa la

producción de progesterona de las células lúteas grandes pero actuando en sinergia con la prolactina y la hormona del crecimiento (Yuan y Lucy, 1996).

3.6.4. Lactógenos placentarios

Los lactógenos placentarios son producidos por las células binucleadas del trofoblasto exclusivamente durante la preñez (Anderson *et al.*, 1999) y son parte de una extensa familia de hormonas que incluyen a la hormona del crecimiento y a la prolactina. Sus efectos han sido poco estudiados y muchas acciones se le han atribuido a las otras dos hormonas. En rumiantes ha sido evaluado su metabolismo materno intermediario, el crecimiento mamario y la esteroidogénesis en el ovario. En borregas preñadas, especie en la cual, Kelly *et al.* (1974) los observaron por primera vez, y vieron que aumentaba su concentración al paralelo que la de la secreción de progesterona. Es por eso que algunos investigadores piensan que los lactógenos juegan un papel en el mantenimiento del cuerpo lúteo durante la preñez temprana en ovejas (Gregoraszcuk *et al.*, 2000).

Los lactógenos placentarios llamados también somatomamotropos, incrementan el tamaño del CL en la vaca, incrementando los niveles de progesterona en plasma (Anderson *et al.*, 1999).

3.6.5. Estrógenos

Los estrógenos, tienen un papel importante en el mantenimiento del cuerpo lúteo de roedores. En ratas hipofisectomizadas e histerectomizadas, a las cuales se les administró prolactina, estradiol o una combinación de éstos, se observó que la administración de prolactina en combinación con estradiol, aumentaba significativamente la producción de progesterona, en relación con los tratamientos donde se aplicaba una sólo hormona, por lo que se sugiere, que el estradiol actúa en sinergia con la prolactina (Frasor y Gibori, 2003). Se ha visto, que esta combinación también estimula la síntesis proteica y la hipertrofia de las células lúteas (Gibori, 1993 citado por Anderson, 1999). Además se ha demostrado, en diversos estudios realizados con diferentes mamíferos, entre ellos, el bovino, que el estradiol, incrementa la habilidad de la progesterona para inhibir a la LH (Chabbert-Buffet *et al.*, 2000).

3.6.6. Prostaglandinas

La prostaglandina E₂ tiene funciones contrarias de la PGF_{2α}. PGF_{2α} es mitogénica, angiogénica, antiapoptótica y vasodilatadora, además, en el sistema reproductor de la hembra se le considera luteoprotectora (Wiltbank *et al.*, 1992; McCracken *et al.*, 1999). Si se administra intrauterinamente,

protege al CL de una luteólisis espontánea o inducida en los rumiantes. Además estimula la secreción de progesterona por medio de AMPc, la cual activa a su vez el mecanismo de la Proteína cinasa A. Se sabe, que el tejido lúteo tiene la capacidad de producir prostaglandinas, ya que la membrana celular contiene gran cantidad de ácidos grasos, como el ácido araquidónico, precursor de las prostaglandinas. Cuando sucede el crecimiento del CL, la prostaglandina que más se produce es la PGE₂, protegiendo así al CL (Arosh *et al.*, 2004).

3.7. GnRH y análogos

3.7.1. Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

El GnRH es un péptido de 10 aminoácidos (Clarke y Pompolo, 2005; Millar, 2005) y es iniciador de la cascada hormonal reproductiva (Millar, 2005). Es procesado en neuronas especializadas del hipotálamo como un polipéptido precursor por acción enzimática y empaquetado en gránulos que son transportados axón abajo hacia la eminencia media (Millar, 2005). La secreción del GnRH, es en pulsos sincronizados, y su vida media en plasma es muy corta, de 2 a 4 minutos (Conn y Crowley, 1991). Para estimular la síntesis de LH y FSH, se requiere que el GnRH se secrete intermitentemente (Conn y Crowley, 1991). La frecuencia de los pulsos es más alta en el pico pre-ovulatorio de LH y más baja durante la fase lútea del ciclo (Millar, 2005). La constante estimulación de la hipófisis, por parte del GnRH o de un análogo, resulta en la desensibilización de la hipófisis y en la disminución en la secreción de gonadotropinas (Conn y Crowley, 1991).

Se cree, que la función directa del GnRH, era sobre las gónadas por encontrarse receptores en esta zona, y que posteriormente la acción sobre la hipófisis fue una cuestión de evolución (Millar, 2005).

En la especie que más se ha estudiado el control de la síntesis y secreción de GnRH, es en la oveja, por el fácil acceso a sus vasos sanguíneos porta hipofisarios, permitiendo un análisis minuto a minuto de los patrones de secreción y los cambios que ocurren durante el ciclo estral. Así se ha podido observar el efecto de los esteroides, por ejemplo en hembras ovariectomizadas el efecto a largo plazo de progesterona y estrógenos inhiben la secreción de GnRH, mientras que los efectos transitorios de una elevación de estrógenos en los niveles causan retroalimentación positiva. Estos efectos esteroidales pueden explicar los patrones de secreción de LH (Clarke y Pompolo, 2005).

La secreción de GnRH durante la fase lútea del ciclo, se caracteriza por pulsos de alta amplitud y baja frecuencia. Al final de la fase lútea, con la disminución drástica de los niveles de progesterona plasmáticos, la frecuencia de los pulsos de GnRH y LH se incrementa. En la fase folicular los niveles de estrógenos se elevan, la frecuencia de los pulsos de GnRH se incrementan y la amplitud disminuye. El pico preovulatorio de LH se asocia con un aumento en la secreción de GnRH. Es así como se ha demostrado por medio de muchos estudios los papeles preponderantes tanto de los estrógenos como de la progesterona en el control de la secreción de GnRH (Clarke y Pompolo, 2005). La progesterona actúa de dos maneras en la secreción de GnRH. En la borrega durante la fase lútea este esteroide limita la frecuencia de los pulsos y hay un efecto mínimo en los niveles de la hipófisis. La elevación continua de los niveles de progesterona plasmática previenen el pico preovulatorio de LH, el cual es debido al bloqueo del pico de GnRH. La progesterona también actúa durante la fase lútea para prevenir al cerebro de las acciones de los estrógenos y así afecta el tiempo de los pulsos de GnRH y LH. Los estrógenos parecen activar a las células del hipotálamo medio basal para causar el pico de GnRH y LH. Los esteroides gonadales como estrógenos y progesterona son reguladores cíclicos de la secreción de GnRH, no se considera que tengan efectos directos en las neuronas GnRH ya que sus efectos en la síntesis de GnRH debe involucrar intermediarios neuronales (Clarke y Pompolo, 2005).

3.7.1.1. Receptor

El receptor pertenece a la familia de receptores unidos a proteína G con siete pasos transmembranales careciendo de dominio intracelular que es la terminal C, lo cual hace que el sistema no se desensibilice en sentido estricto y los receptores se internalicen muy pobremente, es decir que la desensibilización no depende de la inactivación o el reciclaje de los receptores, sino de mecanismos posteriores al receptor (Chabbert-Buffet *et al.*, 2000; Counis *et al.*, 2005). Para que se propague el mensaje hormonal, se necesita un cambio en la conformación del receptor, pues se forma el complejo hormona, receptor y proteína G. En el caso particular de los agonistas, existe la formación del complejo receptor-proteína G, el cual tiene una alta afinidad a los agonistas y se estabiliza con éstos. Cuando se une el GTP a la proteína G, el receptor vuelve a su conformación de baja afinidad y el complejo se disocia. Hay un modelo que propone que los receptores fluctúan entre una forma inactiva y otra activa. La forma activa tiene gran afinidad por los agonistas y es la única manera que se unen a proteína G (Millar, 2005). La clásica forma de activación en los gonadotropos es que se une a proteína Gq con la activación de la fosfolipasa C y la producción de inositol

trifosfato que promueve la movilización de calcio, la producción de diacilglicerol y la activación de proteínkinasa C (Pawson y McNeilly, 2005).

3.7.2. Análogos

Los agonistas y antagonistas son análogos hormonales, es decir tienen una estructura molecular similar a la hormona endógena (Senger, 2003). Las grandes aplicaciones clínicas de análogos de GnRH ha suscitado que se realicen estudios detallados en cuanto a su fisiología, biología celular y función molecular de la hormona que nos permita entender el sistema en su conjunto y la aplicación óptima para estos análogos; pudiéndose utilizar ya sea para estimular o para inhibir al eje reproductivo (Millar, 2005). Como promotores de la fertilidad, cuando se usan para inducir la ovulación, para inducir la producción de gametos y hormonas, en el descenso de los testículos en el criptorquidismo, ayudan a que se presente la pubertad, cuando hay un retraso (Millar, 2005). Como inhibidores, cuando se usan como anticonceptivos, ya que inhiben la ovulación y la espermatogénesis, en el cáncer de próstata, en la hipertrofia benigna prostática, en la endometritis, fibrosis uterina, síndrome premenstrual, síndrome de ovarios poliquísticos, hirsutismo, acné, pubertad precoz, en la infertilidad la inhibición de las gonadotropinas endógenas junto con la administración controlada de gonadotropina exógena, especialmente en la inducción de la ovulación en técnicas reproductivas asistidas (Millar, 2005).

3.7.2.1. Agonistas

Los agonistas, son análogos que se unen al receptor específico, algunos causan una actividad fisiológica mayor pues tienen mayor afinidad por el receptor (Senger, 2003), además tienen una vida media más larga que la hormona endógena (D' Ochio, 2002).

La administración de un agonista en la vaca, comprende dos fases: una aguda y una crónica (Conn y Crowley, 1991). En la fase aguda, la cual puede durar días a semanas, la secreción de gonadotropinas, se ve incrementada. La fase crónica se caracteriza por una reducción en los receptores al GnRH, lo cual causa una desensibilización; el vaciamiento del contenido de LH y FSH de la pituitaria, la ausencia de secreción pulsátil de LH, así como la ausencia de picos preovulatorios (Conn y Crowley, 1991; D'Ochio, 2002,).

Se ha reportado que bajas dosis de GnRH liberadas en forma pulsátil equivalentes a las encontradas en los vasos porta (pg/ml) reestablecen la fertilidad en hombre y mujeres con hipogonadismo y son

efectivos también en el tratamiento de pubertad retardada. En cambio, altas dosis de GnRH o agonistas análogos desensibilizan a los gonadotropos con el resultado de un descenso en la LH y FSH y un declive en la función ovárica y testicular. Este mecanismo de desensibilización es ampliamente aplicado en la medicina clínica para el tratamiento de un amplio rango de enfermedades (Millar, 2005).

En trabajos realizados con borregas gestantes utilizando Buserelín observaron que tuvieron partos gemelares, además que aumentaron el peso del ovario y el número de cuerpos lúteos. Los corderos de las borregas tratadas estuvieron más pesadas al nacimiento, se incrementó el peso del útero grávido, el peso de las carúnculas y la placenta, además se aumentó la producción de progesterona así como la producción de interferón- τ (Cam y Kuran, 2004).

Por otro lado, cuando se utilizó deslorelin en vacas altas productoras, se indujo la formación de CL accesorios incrementándose las concentraciones de progesterona. Es importante mencionar que estos animales con grandes exigencias metabólicas, su concentración de progesterona es baja durante la fase lútea debido a un incremento del flujo sanguíneo al hígado, contribuyendo a una alta tasa de metabolismo esteroide y por consiguiente la pérdida de la preñez (Bartolomé *et al.*, 2006).

La supresión del crecimiento folicular en vaquillas tratadas a largo plazo con agonistas, se debe a la falta de soporte gonadotrópico más que a una acción directa del agonista en los ovarios; como se demuestra en vaquillas tratadas con un agonista por seis meses, en las cuales después de retirado el tratamiento, se administra FSH por 4 días seguida de una inyección de LH, induciéndose crecimiento folicular (D'Ochio, 2000).

3.7.2.2. Antagonistas

Otros análogos son los antagonistas, que tienen una mayor afinidad hacia el receptor, pero a diferencia de los agonistas, la unión con el receptor, no promueve ningún tipo de metabolismo ni actividad celular (Conn y Crowley, 1991). Los antagonistas ocupan los receptores, previniendo que la hormona endógena se una a éstos (Senger, 2003). Es decir los antagonistas inhiben el sistema reproductivo a través de la competencia con la hormona endógena, además, las dosis requeridas son más altas para desensibilizar al sistema, por lo cual son menos usados (Millar, 2005).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Ubicación Geográfica

El estudio se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (C.E.I.E.G.T.) perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. ubicado en la carretera Martínez de la Torre – Tlapacoyan km. 5.5 Tlapacoyan, Veracruz.

4.2. Unidades experimentales

Se utilizaron 12 vacas F1 cruce cebú x Holstein de 98 días de gestación.

4.3. Diseño experimental

Las vacas se asignaron en dos grupos, balanceando por el tiempo de gestación. Un grupo sirvió como testigo (n=6) y al otro (n= 6) se le administró 2.5 µg/h de un agonista de GnRH (Acetato de Buserelín Ltd ®, concentración 15.75 mg/ml Hoechst Marion Roussel) en forma continua por medio de una bomba osmótica (2 ML4 ALZET®) de acuerdo al método descrito por Gong *et al.* (1996).

El día previo a la inserción de la bomba a los animales, las bombas se llenaron con 2 ml de acetato de Buserelín y se incubaron en solución salina por 12 horas para que comenzaron a funcionar. La bomba se insertó en el animal como se describe a continuación: El animal estuvo contenido en una manga de manejo, administrándosele vía intramuscular 0.7 ml de xilazina al 2% (Rompun®, Bayer), 10 minutos más tarde se insensibilizó el área caudal a la escápula con 4 ml de lidocaina, se rasuró y se lavó el área con agua y jabón neutro, se embrocó con antiséptico, y se procedió hacer una incisión horizontal de aproximadamente 2.5 cm en la piel del animal. La bomba se depositó subcutáneamente, finalmente se cerró con 2 puntos separados, y se aplicó pomada amarilla (Sulfas, Brovel®) para evitar la contaminación por moscas y neguvón polvo (Tricorphon al 97%®, Bayer). La bomba fue reemplazada en 7 ocasiones a intervalos de 28 días para mantener la liberación continua del agonista de GnRH durante la gestación.

4.4. Muestreo sanguíneo:

En ambos grupos se tomaron muestras de sangre 3 veces por semana desde el momento de la inserción de la bomba osmótica y por dos semanas. A partir de los 110 y hasta los 155 días de gestación, los muestreos se hicieron lunes y jueves. De los 169 días de gestación, hasta que ocurrió

el parto se tomaron muestras con un intervalo de 15 días. Las muestras de sangre se colectaron por venopunción de la vena caudal, en tubos vacutainer que contenían EDTA. Las muestras sanguíneas, se centrifugaron por 20 minutos a 3000 r.p.m. colectando el plasma en alícuotas identificadas y se mantuvieron a -20° C hasta su análisis para determinar la concentración de progesterona.

4.5. Desafío a la hipófisis con GnRH

En el día 40 del tratamiento (128 días de gestación), se administró en ambos grupos 0.021 mg de GnRH (Conceptal® Intervet) intramuscularmente, para evaluar la liberación de LH en respuesta al GnRH por la hipófisis, y corroborar si existía inhibición de la liberación de LH. Se tomaron muestras de sangre cada hora, iniciando dos horas antes de la inyección y hasta 6 horas después. A estas muestras se les midió la concentración plasmática de LH.

4.6. Radioinmunoanálisis (RIA)

Las concentraciones plasmáticas de progesterona se determinaron por medio de radioinmunoanálisis (RIA) en fase sólida empleando el kit Coat-A-Count® Progesterone (Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA., U.S.A.) en el laboratorio de Endocrinología de la FMVZ-UNAM (Pulido *et al.*, 1991). La sensibilidad del ensayo fue de 0.1 ng/ml, con un coeficiente de variación de 4.25% intraensayo.

Las concentraciones plasmáticas de LH se determinaron por medio de radioinmunoanálisis (RIA) en fase líquida (Perera, 2005) con una sensibilidad de 0.01 ng/tubo y con un coeficiente de variación de 5.02 % intraensayo.

4.7. Análisis Estadístico

El efecto del tratamiento en las concentraciones plasmáticas de LH y progesterona se determinaron por Análisis de Varianza (ANDEVA) para mediciones repetidas (Daniel, 2004), en un modelo que incluía como variables independientes al tratamiento, el animal anidado dentro del tratamiento, los días de gestación o tiempo después del reto con GnRH y la interacción entre tratamiento y tiempo.

Las concentraciones de LH se transformaron a logaritmo previo a su análisis para corregir por la heterocedasticidad de la varianza.

5. RESULTADOS

5.1. Concentraciones plasmáticas promedio de progesterona en vacas tratadas o no, crónicamente con acetato de buserelín (2.5 µg/hora)

Las vacas tratadas ovularon y formaron un segundo cuerpo lúteo en respuesta a la inserción de la primera bomba osmótica. Las concentraciones promedio de progesterona durante el tratamiento crónico con buserelín fueron mayores ($P < 0.05$) en las vacas del grupo buserelín (12.8 ± 0.04 ng/ml) comparadas con las concentraciones de progesterona en vacas del grupo testigo (6.8 ± 0.029 ng/ml).

En la figura 1, se observa, que las concentraciones promedio de progesterona en vacas testigo se mantuvieron entre los 3 y 6 ng/ml hasta el día 155 de gestación, el día 169 ocurrió un aumento a 9 ng/ml, disminuyendo de nuevo para el día 183 a 6 ng/ml. Hubo otro aumento en el día 253, pero a partir de ese día fue disminuyendo hasta el día 295 cerca del parto.

Las concentraciones promedio de progesterona en vacas tratadas aumentaron 3 días después de iniciado el tratamiento hasta superar los 10 ng/ml en el día 101 de gestación, con un aumento continuo hasta el día 113 por arriba de los 16 ng/ml. Se observa una meseta hasta el día 120, cuando comienza a disminuir hasta el día 128 por debajo de los 12 ng/ml. Se observa un tercer aumento, hasta alcanzar de nuevo los 16 ng/ml en el día 134, día que empieza a disminuir hasta el día 152 a los 10 ng/ml. Aparece un incremento final que alcanza un pico en el día 197, pero a partir de este día empiezan a disminuir, hasta casi igualarse con las concentraciones de las vacas del grupo testigo y seguir disminuyendo hasta el parto.

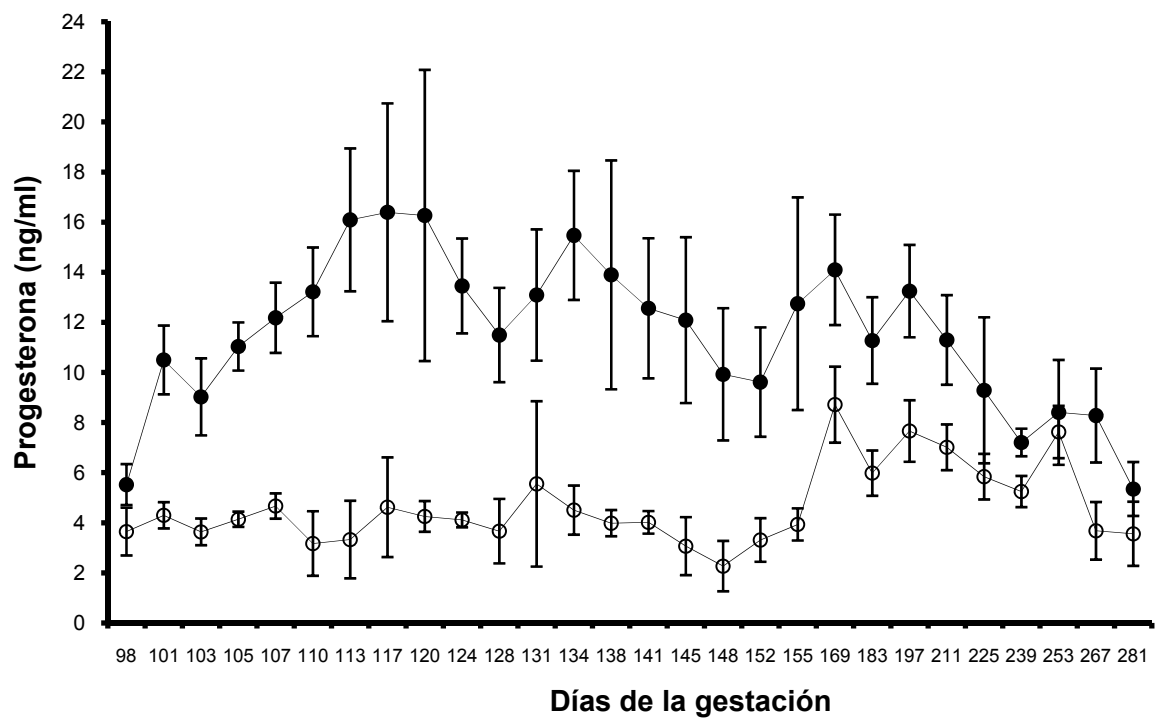


Figura 1. Concentraciones promedio de progesterona en vacas testigo (-○-) y vacas con un tratamiento crónico con 2.5 µg/hora de buserelín (-●-).

5.2. Concentraciones promedio de LH en vacas testigo y en vacas con un tratamiento crónico con 2.5 µg/hora de buserelín

Se encontraron diferencias ($P < 0.05$) en las concentraciones promedio de LH, entre vacas del grupo testigo y vacas del grupo tratado.

En la figura 2 se observan, las concentraciones promedio de LH, en las vacas del grupo testigo se mantuvieron entre los 0.03 y 0.04 ng/ml, hasta tener un descenso a 0.018 ng/ml en el día 131 de gestación, momento en el que se observó un aumento agudo para el día 134 de gestación, hasta llegar casi a 0.082 ng/ml, pero posteriormente vuelve a descender y mantenerse en los niveles anteriores hasta tener de nuevo otro aumento, a 0.03 ng/ml en el día 267 de gestación, hasta llegar a 1 en el día 295 de gestación.

En vacas del grupo tratado, las concentraciones promedio de LH, tienen un aumento inmediato al tercer día del inicio del tratamiento hasta llegar a los 0.22 ng/ml. Desde los días 101 al 183 de gestación, las concentraciones se mantienen entre los 0.06 y 0.3 ng/ml. En el día 197 de gestación, las concentraciones comienzan a igualarse con las concentraciones en vacas del grupo testigo, se observa un aumento agudo a partir del día 267 de gestación, hasta llegar a 1 ng/ml.

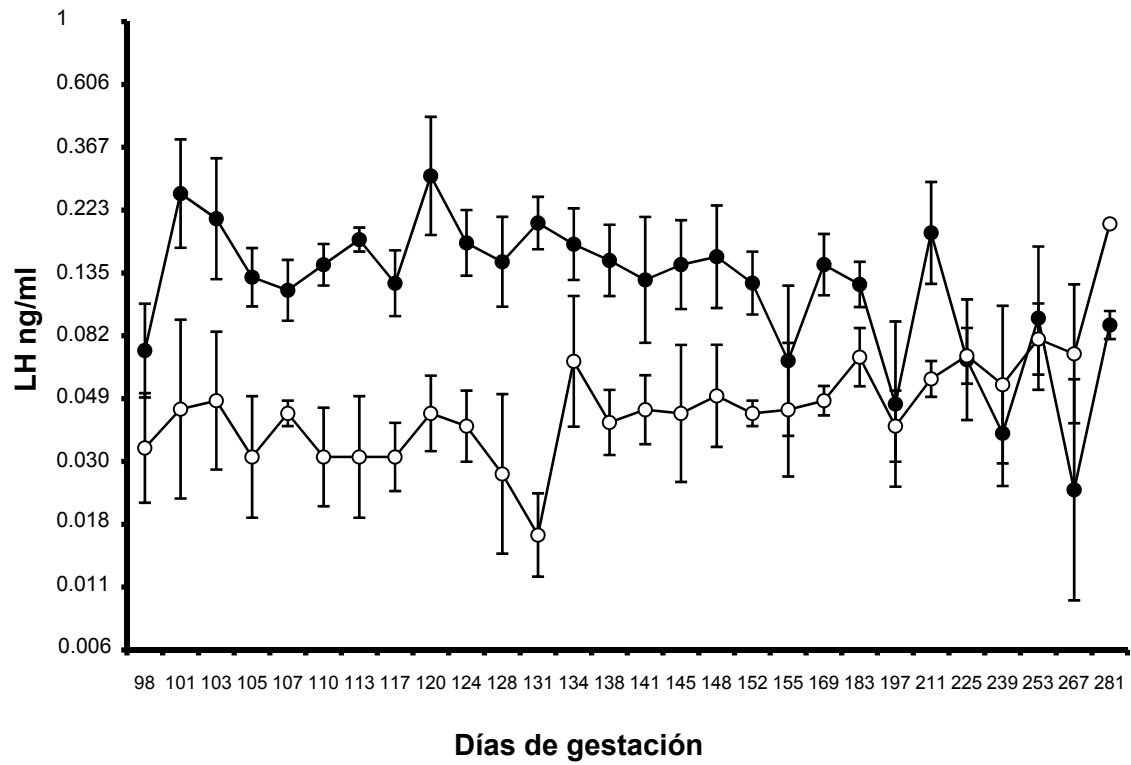


Figura 2. Concentraciones promedio de LH en vacas testigo (-○-) y en vacas con un tratamiento crónico con 2.5 µg/hora de buserelín (-●-).

5.3. Concentraciones promedio de progesterona en vacas tratadas o no, durante el desafío que se realizó a la hipófisis con GnRH.

Previo a la inyección de GnRH nativa las concentraciones difirieron entre grupos. No se encontró un aumento en las concentraciones promedio de progesterona en vacas tratadas crónicamente o no con buserelín durante el desafío a la hipófisis con GnRH, entre grupos ($P= 0.06$).

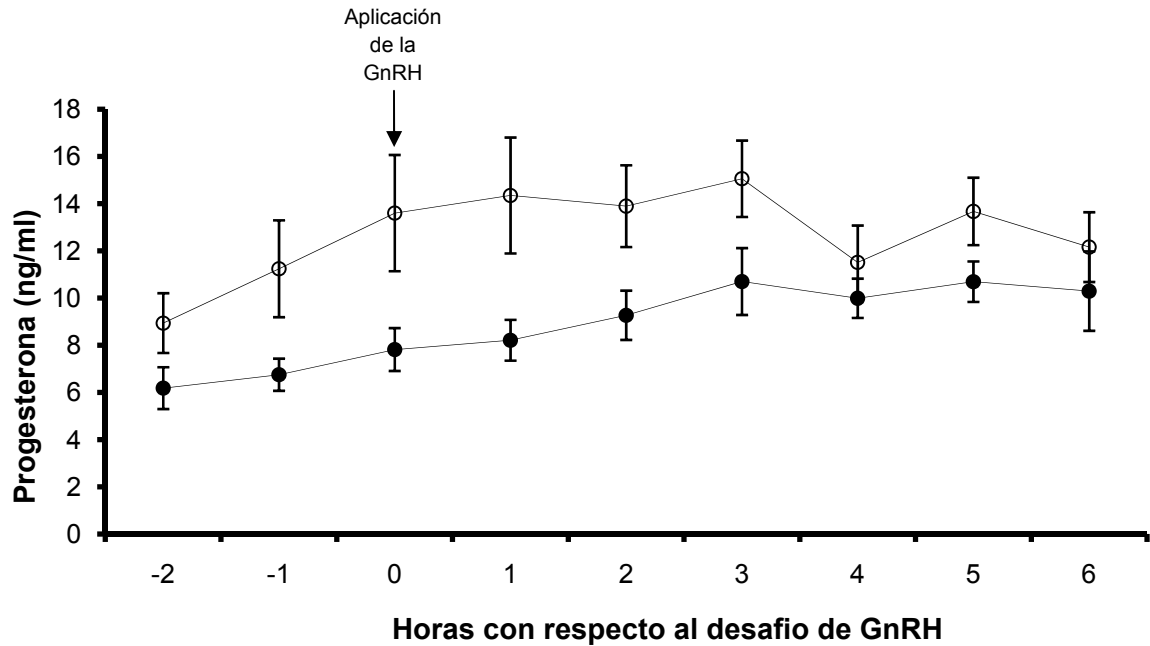


Figura 3. Concentraciones promedio de progesterona en vacas tratadas (-●-) o no (-○-), durante el desafío que se realizó a la hipófisis con GnRH.

5.4. Concentraciones promedio de LH en vacas tratadas o no, durante el desafío que se realizó a la hipófisis con GnRH

Las concentraciones basales promedio de LH previo al desafío a la hipófisis con GnRH, fueron mayores ($P < 0.05$) (1.77 ± 0.25 ng/ml) en las vacas del grupo testigo que en las vacas del grupo tratado (buserelín) (0.40 ± 0.23 ng/ml).

En la figura 4, observamos que las concentraciones promedio tanto en vacas del grupo testigo como en vacas del grupo tratado antes del desafío, son diferentes. Posteriormente, las concentraciones en vacas del grupo testigo comienzan aumentar de manera aguda posterior a la aplicación del GnRH hasta la hora uno, donde alcanza un pico por arriba de los 4 ng/ml. A partir de ese momento, se observó un descenso hasta llegar a igualar a las concentraciones promedio de las vacas del grupo buserelín en la hora seis.

Por otro lado, las concentraciones promedio de LH en vacas del grupo buserelín, aunque estuvieron por arriba de las concentraciones promedio en vacas del grupo testigo, en los dos primeros muestreos anteriores al desafío, se mantuvieron similares en todos los muestreos, observando un ligero aumento del muestreo -1 al 0, y del 5 al 6 ($P > 0.05$).

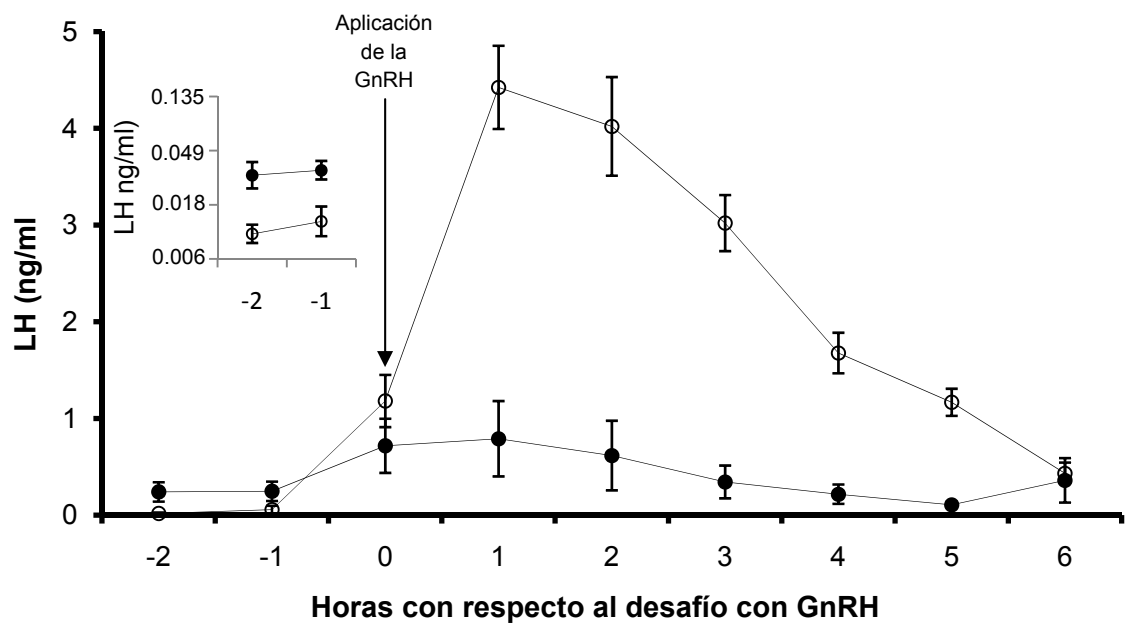


Figura 4. Concentraciones promedio de LH en vacas tratadas (-●-) o no (-○-), durante el desafío que se realizó a la hipófisis con GnRH. Se observa también el comparativo con el logaritmo de LH en los dos primeros muestreos anteriores a la administración de GnRH.

6. DISCUSIÓN

La administración crónica de 2.5 µg por hora de acetato de Buserelín entre los días 98 y 295 de gestación, bloqueó la liberación de LH en respuesta aguda de la hipófisis a la GnRH, sin embargo, no afectó el mantenimiento ni la funcionalidad del cuerpo lúteo, y la gestación se mantuvo hasta término.

Baird (1992), sugiere que la LH es necesaria para la ovulación y la formación del cuerpo lúteo, más no para su mantenimiento. Lo que sugiere que durante la gestación, el cuerpo lúteo no necesita de la pulsatilidad de la LH, para secretar progesterona (Okuda *et al.*, 1999). En estudios donde se han usado agonistas de la GnRH se logra abatir la pulsatilidad de la LH (Gong *et al.*, 1995; D'Occhio *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2006), sin afectar el mantenimiento y la funcionalidad del cuerpo lúteo, indicándonos que el cuerpo lúteo no requiere de un patrón de secreción pulsátil de LH, sino de un aporte basal de liberación tónica de esta hormona, como lo demostraron Gong *et al.* (1996).

En el presente estudio, se observó que las concentraciones promedio de la LH en vacas del grupo tratado estuvieron por arriba de las concentraciones promedio en vacas del grupo testigo durante todo el tratamiento, es decir, el tratamiento no disminuyó las concentraciones de la LH, sino que las aumentó, lo cual difiere con lo encontrado por Gong *et al.* (1995), cuyo estudio realizado en vaquillas no gestantes, con la administración crónica de un agonista, disminuyó la concentración promedio de la LH. Esta diferencia pudiera deberse al estado fisiológico de los animales, la duración del tratamiento, así como al protocolo de experimentación. En el presente estudio se trabajaron vacas gestantes, y el tiempo de experimentación fueron alrededor de 7 meses, además, la administración del agonista fue a través de una bomba osmótica, mientras que en el citado estudio se utilizaron vaquillas ciclando, el tratamiento duró 10 semanas, y la administración del agonista fue vía intramuscular con una frecuencia de 2 veces al día. No sabemos como se hubieran comportado las concentraciones de LH, si se hubiera prolongado el tiempo de estudio en el trabajo de Gong *et al.* (1996).

Las concentraciones de la LH concuerdan con lo reportado por Schneider *et al.* (2006) quienes reportaron que después de la administración crónica con un agonista de GnRH en vacas ciclando, la concentración de la LH basal se elevó en los animales tratados a 1.2 ng/ml con respecto a los animales testigo que tenían 0.6 ng/ml, sugiriendo que es debido a un mecanismo regulatorio independiente del sistema GnRH y su receptor, donde los gonadotropos monohormonales que

producen LH se incrementan. Por lo cual, parece ser importante que haya concentraciones de LH durante la gestación, ya que en estudios realizados por Okuda (1999) se encontró la misma cantidad de receptores para LH en cuerpos lúteos de vacas gestantes y ciclando, sugiriendo que la concentración basal y no la pulsatilidad de LH, es la que juega el papel importante en cuanto al funcionamiento del CL.

En este estudio, al realizarse el desafío, para ver el comportamiento de las hipófisis de vacas testigo y vacas tratadas con un agonista de GnRH, se observó que mientras las hipófisis de las vacas testigo, eran aún capaces de liberar LH en respuesta al GnRH, con una amplitud de 3.24 ± 0.16 ng/ml, las vacas tratadas crónicamente con un agonista de GnRH, liberaron LH con una amplitud de 0.47 ± 0.18 ng/ml, y la concentración, no difirió de las concentraciones previas a la inyección con GnRH, lo cual indicó, que efectivamente las hipófisis de las vacas tratadas se encontraban desensibilizadas por el efecto del agonista, es decir el tratamiento provocó una baja sensibilidad al GnRH y los niveles basales de LH disminuyeron la cantidad de LH almacenada, resultando en una pobre liberación de LH (Arreguín-Arévalo y Nett, 2005), mientras que las hipófisis de las vacas del grupo testigo tuvieron una respuesta fisiológica normal.

La utilización del agonista aumentó la concentración promedio de progesterona en las vacas del grupo tratado durante el periodo de experimentación, ya que se duplicó la concentración con respecto a las vacas del grupo testigo. Este estudio concuerda con lo obtenido por Schneider *et al.* (2006) donde observaron, que después de administrar un agonista por cuatro semanas en vaquillas ciclando, la concentración de progesterona fue mayor ($P < 0.05$) en animales tratados con respecto a los animales testigo.

Esto concuerda con el trabajo de Gong *et al.* (1996) quien mostró que al inicio del tratamiento con el agonista hay un aumento en las concentraciones de progesterona y LH antes que el efecto crónico se vuelva inhibitorio.

Existen varios factores, por los que la progesterona aumentó, como la formación de un cuerpo lúteo accesorio (Cam y Kuran, 2004), el cambio en la proporción de células lúteas conforme avanza la gestación (Arikan y Yigit, 2001), la regulación de la propia progesterona (Niswender, 2002), y la influencia de factores de crecimiento y hormonas metabólicas (Alvarez *et al.*, 2000). En estudios previos, donde se han utilizado agonistas de GnRH en bovinos se ha observado la formación de

cuerpos lúteos accesorios, así lo demostró el estudio realizado por Bartolomé *et al.* (2006) donde utilizaron vacas lecheras gestantes, administrándoles un implante que contenía un agonista de GnRH. Los animales tratados desarrollaron un cuerpo lúteo accesorio, además que tuvieron niveles de progesterona por arriba de los animales testigo, asimismo, Cam y Kuran (2004), administraron busserelín en ovejas gestantes ocasionando, la formación de cuerpos lúteos accesorios y un aumento en las concentraciones de progesterona (Cam y Kuran, 2004).

En el bovino, al avanzar la gestación, la proporción de células lúteas cambia (Arikan y Yigit, 2001); es decir, las células lúteas pequeñas que son responsivas a LH, se vuelven células lúteas grandes, que no necesitan de LH para producir progesterona (Alila y Hansel, 1984; Arikan y Yigit, 2001). Esto nos permite pensar que la proporción de células lúteas grandes que no necesitan de LH para producir progesterona, va en aumento conforme avanza la gestación. Esto concuerda con lo observado en ovejas por Alila *et al.* (1988), la proporción de células lúteas grandes es significativamente mayor que las pequeñas, y las grandes producen más progesterona sin responder a LH.

Por otro lado, McNeilly (1992) reporta que el tratamiento con un antagonista en borregas ciclando, suprimió la secreción pulsátil de LH pero no las concentraciones de progesterona. Lo anterior sugiere que en algunas especies, la liberación de progesterona es de manera constitutiva por parte de las células lúteas grandes (Díaz, 2002), ya que es independiente del estímulo de LH. La producción de progesterona es considerada el camino más simple de la esteroidogénesis, ya que utiliza muy pocas enzimas, además en los rumiantes, son abundantes, las lipoproteínas de alta densidad (HDL), contando con receptores en el CL, siendo un efecto estimulador de la producción de progesterona (Díaz, 2002). En adición, el efecto que tiene LH sobre las células lúteas pequeñas, entre otros, es la formación de AMPc (Schams y Berisha, 2004) con la subsecuente regulación a la alta de enzimas específicas necesarias para la síntesis de progesterona (Kotwica *et al.*, 2002). Ahora bien, en el presente trabajo, las concentraciones de LH se vieron aumentadas en vacas del grupo tratado con respecto a vacas testigo, lo cual nos explicaría, en parte, porque las concentraciones de progesterona se vieron aumentadas de igual forma, ya que la LH es crítica para la capacidad esteroidogénica a largo plazo de las células lúteas, ya que mantienen cantidades normales de RNAm que codifica para 3 β hidroxi esteroide deshidrogenasa, P450 y STAR (Niswender, 2002).

Es por esto, que se piensa, que si se logra inhibir la pulsatilidad de la LH en vacas gestantes, debe de haber una serie de mecanismos, hormonas, factores de crecimiento y células que permitan el mantenimiento y la función del cuerpo lúteo.

7. CONCLUSIONES

La disminución en la pulsatilidad de LH, no afecta la funcionalidad del cuerpo lúteo, es decir, al parecer, aunque la LH es luteotrópica, la pulsatilidad no es necesaria para que el cuerpo lúteo secrete progesterona.

La concentración basal incrementada de LH es suficiente para mantener la función del CL en la ausencia de la liberación pulsátil de LH.

8. LITERATURA CITADA

1. Acosta TJ, Yoshizawa N, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum alter prostaglandin F₂ α injection in the cow. *Biology Reproduction* 2002;66:651-658.
2. Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction* 2003;125:759-767.
3. Acosta TJ, Miyamoto A. Vascular control of ovarian function: Ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science* 2004;82-83:127-140.
4. Alila HW. Control of progesterone production in small and large bovine luteal cells separated by flow cytometry. *Journal of Reproduction and Fertility* 1988;82(2):645-655.
5. Alila HW, Hansel W. Origin of difference cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biology of Reproduction* 1984;10:15-1025.
6. Alvarez P, Spicer LJ, Chase CC, Payton ME, Hamilton TD, Stewart RE, Hammond AC, Olson TA, Wetteman RP. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in angus Brahman and Senepol cows in a subtropical environment. *Journal Animal Science* 2000;78:1291-1302.
7. Anderson LL, Hard DL, Carpenter LS, Awotwi EK, Diekman MA, Trenkle AH and Cho S-J. Pregnancy, parturition, and lactation in hypophyseal stalk-transected beef heifers. *Journal Endocrinology* 1999;163:463-475.
8. Arikan S and Yigit A. Size distribution of bovine steroidogenic luteal cells during pregnancy. *Animal Science* 2001;73:323-327.
9. Arreguin-Arevalo J and Nett TM. A nongenomic action of 17 β -Estradiol as the mechanism underlying the acute suppression of Luteinizing Hormone. *Biology Reproduction* 2005;73:115-122.
10. Armstrong DG, Baxter G, Hogg CO, Woad KJ. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. *Reproduction* 2002;123:789-797.
11. Arosh JA, Banu SK, Chapdelaine P, Madore E, Sirois J and Forter MA. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: A basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology* 2004;145:2551-2560.

12. Awotwi EK, Keeney DS, Hard DL, Anderson LL. Effects of pulsatile infusion of luteinizing hormone-releasing hormone on luteinizing hormone secretion and ovarian function in hypophysial stalk-transected beef heifers. *Biology Reproduction* 1984;989-999.
13. Baird D. Luteotrophic control of the corpus luteum. *Animal Reproduction Science* 1992;28:95-102.
14. Bartolome JA, Kamimura S, Silvestre F, Arteché ACM, Trigg T, Thatcher WW. The use of a deslorelin implant (GnRH agonist) during the late embryonic period to reduce pregnancy loss. *Theriogenology* 2006;65:1443-1453.
15. Bauer M, Reibiger I, Spanel B. Leucocyte proliferation in the bovine corpus luteum. *Journal of Reproduction and Fertility* 2001;1470-1626.
16. Bazer FW, Ott TL and Spencer TE. Pregnancy recognition in ruminants, pigs and horses: Signals from the trophoblast. *Theriogenology* 1994;41:79-94.
17. Bearden HJ and Fuquay JW. *Applied Animal Reproduction*. Fifth Edition. New Jersey, U.S.A.: *Prentice Hall*, 2000.
18. Berridge MJ and Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989; 341(6239): 197-205.
19. Bhoola KD, Figueroa CD and Worthy K. Bioregulation of kinins: Kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacological Reviews* 1992;44:1-80.
20. Cam MA, Kuran M. Effects of a single injection of hCG or GnRH agonist on day 12 post mating on fetal growth and reproductive performance of sheep. *Animal Reproduction Science* 2004;80:81-90.
21. Campbell BK, Souza C, Gong J, Webb R, Kendall N, Marsters P, Robinson G, Mitchell A, Telfer EE and Baird DT. Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reproduction* 2003;(Suppl 61):429-443.
22. Cassar CA, Dow MP, Pursley JR, Smith GW. Effect of the preovulatory LH surge on bovine follicular progesterone receptor mRNA expression. *Domestic Animal Endocrinology* 2002;22:179-187.
23. Chabbert-Buffet N, Skinner DC, Caraty A, Bouchard P. Neuroendocrine effects of progesterone. *Steroids* 2000;65:613-620.
24. Chandrashekar V, Zaczek D and Bartke A. The consequences of altered somatotrophic system on reproduction. *Biology Reproduction* 2004;71:17-27.

25. Chen JC, Lin JH, Wu LS, Tsai YF, Su TH, Chen ChJ, and Chen TJ. Luteotropic roles of prolactin in early pregnant hamsters. *Biology Reproduction* 2002;67:8-13.
26. Clarke IJ, Pompolo S. Synthesis and secretion of GnRH. *Animal Reproduction Science* 2005;88:29-55.
27. Conn M, Crowley WF. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *The New England Journal of Medicine* 1991;324:93-101.
28. Counis R, Laverrière JN, Garrel G, Bleux C, Cohen-T J, Lerrant Y, Kottler ML, Magre S. Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. *Reproduction Nutrition Development* 2005;45:243-254.
29. Daniel W. *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud*. 4ª. Ed. México: Limusa Wiley, 2004.
30. Davis JS, May JV and Keel BA. Mechanisms of hormone and growth factor action in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* 1996;45:1351-1380.
31. De los Reyes M, Villagrán ML, Cepeda R, Duchens M, Parraguez V, Urquieta. Histological Characteristics and steroid concentration of ovarian follicles at different stages of development in pregnant and non-pregnant dairy cows. *Veterinary Research Communications* 2006;30:161-173.
32. Del Vecchio, RP, Thibodeaux RD, Randel RD and Hansel W. Interactions between large and small bovine luteal cells in a sequential perfusion co-culture system. *Journal of Animal Science* 1994;72:963-968.
33. Denamur R, Martinet J and Short RV. Secretion of progesterone by corpus luteum of the ewe after hypophysectomy, pituitary stalk section, and hysterectomy. *Acta Endocrinology* 1966;52:72-90.
34. Díaz FJ, Anderson LE, Wu YL, Rabot A, Tsai SJ, Wiltbank MC. Regulation of progesterone and prostaglandin F₂ α production in the CL. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002;191:65-80.
35. D'Occhio MJ, Fordyce G, Whyte TK, Aspden WJ, Trigg TE. Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. *Animal Reproduction Science* 2000;60-61:433-442.
36. D'Occhio MJ, Fordyce G, Whyte TK, Jubb T, Fitzpatrick LA, Cooper NJ, Aspden WJ, Bolam MJ, Trigg TE. Use of GnRH agonist implants for long-term suppression of fertility in extensively managed heifers and cows. *Animal Reproduction Science* 2002;74:151-162.

37. Einer-Jensen N and McCracken JA. Physiological aspects of corpus luteum blood flow and of the counter current system in the ovarian pedicle of the sheep. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1981; 89:101.
38. Espey L. and Lipner H. Ovulation. In: Knobil E and Neill J. *The Physiology of Reproduction*. Vol. 1. Second Edition. New York: *Raven Press Ltd.*, 1994: 744-763.
39. Ezashi T and Roberts M. Regulation of interferon τ (IFN- τ) gene promoters by growth factors that target the Ets-2 composite enhancer: A possible model for maternal control of IFN- τ production by the conceptus during early pregnancy. *Endocrinology* 2004;145(10):4452-4460.
40. Fairchild D, and Pate JL. Tumor necrosis factor α alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. *Endocrinology* 1992;130(2):854-860.
41. Fields MJ, Fields PA. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. *Theriogenology* 1996;45:1295-1325.
42. Fitz TA, Mayan MH, Sawyer HR and Niswender GD. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. *Biology of Reproduction* 1982;27:703-711.
43. Frasor J and Gibori G. Prolactin regulation of estrogen receptor expression. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 2003;14(3):118-123.
44. Galina C. *Reproducción de animales domésticos*. Ed. Limusa, 2^a Ed. México, 2006.
45. Gibori G. The corpus luteum of pregnancy. In: *The Ovary*, pp 261-317 Eds EY Adashi and PCK Leung. New York: Raven Press. 1993.
46. Gibori G. Signaling mechanisms and gene expression in the ovary. Book review. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 1993;4:
47. Ginther OJ. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science* 2000;60-61:61-79.
48. Girsh E, Wang W, Mamluk R, Arditi F, Friedman A, Milvae RA and Meidan R. Regulation of endothelin-1 in the bovine corpus luteum: Elevation by prostaglandin F₂ alpha. *Endocrinology* 1996;137:5191-5196.
49. Gong JG, Bramley TA, Gutiérrez CG, Peters AR and Webb R. Effects of chronic treatment with gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 1995;105:263-270.

50. Gong JG, Campbell BK, Bramley TA, Gutiérrez CG, Peters AR, Webb R. Supresión in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biology of Reproduction* 1996;55:68-74.
51. Gootwine E. Placental hormones and fetal-placental development. *Animal Reproduction Science* 2004;82-83: 551-566.
52. Gregoraszczyk EL, Zieba D, Wierzchoś E, Murawski M, Gertler A. Placental lactogen as a regulator of luteal cells function during pregnancy in sheep. *Theriogenology* 2000;53:877-885.
53. Gutiérrez AC. 2006. "Pubertad, ciclo estral y estacionalidad". En Galina C. y Valencia J. (Compiladores). *Reproducción de animales domésticos*. 2ª. Edición. México: Limusa editores, 2006: 85-116.
54. Hafez ESE y Hafez B. Foliculogénesis, maduración del óvulo y ovulación. En: Hafez ESE y Hafez B. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 7ª. Ed. México: *Mc. Graw-Hill Interamericana*, 2002: 70-83.
55. Inskip EK. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *Journal Animal Science* 82 (E. Suppl.) E: 24-E39 (2004).
56. Jenkin G, Young IR. Mechanisms responsible for parturition; the use of experimental models. *Animal Reproduction Science* 2004;82-83:567-581.
57. Kann G and Denamur R. Changes in plasma levels of prolactin and LH induced by luteolytic or lutetrophic treatment in intact cycling sheep after section of the pituitary stalk. *Acta Endocrinologica* 1973;73:625-634.
58. Kooistra HS, Okkens AC. Secretion of growth hormone and prolactin during progression of the luteal phase in healthy dogs: a review. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002;197:167-172.
59. Kotwica J, Bogacki M, Rekawiecki R. Neural regulation of the bovine corpus luteum. *Domestic Animal Endocrinology* 2002;23:299-308.
60. Lebedeva I, Denisenko Y, Lebedev VA, Kuzmina TI. Prolactin in follicular fluid and intracellular store calcium in follicular cells are related to morphological signs of ovarian follicle atresia in cows. *Theriogenology* 1998; 49:509-519.
61. Lee KY, DeMayo FJ. Animal models of implantation. *Reproduction* 2004;128:679-695.

62. Lucy MC, Thatcher WW, Collier RJ, Simmen FA, Ko Y, Savio JD and Badinga L. Effects of somatotropina on the conceptus, uterus, and ovary during maternal recognition of pregnancy in cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 1995;12:73-82.
63. McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. *Physiological Reviews* 1999;79 (2):263-324.
64. McNeilly AS, Crow WJ, Fraser HM. Suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion by gonadotrophin releasing hormone antagonist does not affect episodic progesterone secretion of corpus luteum function in ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* 1992;96:865-874.
65. Mihm M, Crowe MA, Knight PG and Austin EJ. Follicle wave growth in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 2002;37:191-200.
66. Millar R. GnRHs and GnRH. Receptors. *Animal Reproduction Science* 2005;88:5-28.
67. Murdoch WJ. Microtubular dynamics in granulosa cells of periovulatory follicles and granulosa-derived (large) lutein cells of sheep: relationships to the steroidogenic folliculoluteal shift and functional luteolysis. *Biology of Reproduction* 1996;54:1135–1140.
68. Neuvians TP, Pfaffl MW, Berisha B, Schams D. The mRNA expression of the members on the IGF system in bovine corpus luteum during induced luteolysis. *Domestic Animal Endocrinology* 2003;25:359-372.
69. Niswender G and Nett T. Corpus luteum and its control in infraprimates species. In: Knobil E and Neill J. *The Physiology of Reproduction*. Vol. 1. Second Edition. New York: *Raven Press Ltd.*, 1994: 744-763. (Citado por Schams y Berisha, 2004)
70. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK and McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews* 2000;80(1)1-29.
71. Niswender G. Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction* 2002;123:333-339.
72. Okuda K, Uenoyama AC, Naito AY, Sakabe A and Kawate BC. LH receptors in the bovine corpus luteum during the oestrus cycle and pregnancy. *Reproduction Fertility Development* 1999;11:147-151.
73. Pate JL. Intercellular communication in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* 1996;45:1361-1397.

74. Pawson A, McNeilly A. The pituitary effects of GnRH. *Animal Reproduction Science* 2005;88:79-94.
75. Perera MG, Murcia C, Rojas S, Hernández C, González PE. Pattern of circulating luteinizing hormone isoforms during the estrous and luteal phases in Holstein heifers. *Animal Reproduction Science* 2005;86:53-69.
76. Perks CM, Newcomb PV, Grohmann M, Wright RJ, Mason HD, Holly JMP. Prolactin acts as a potent survival factor against C2-ceramide-induced apoptosis in human granulosa cells. *Human Reproduction* 2003;18(12):2672-2677.
77. Pescador N, Soumano K, Stocco DM, Price DA and Murphy BD. Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea. *Biology of Reproduction* 1996;55: 485-491.
78. Pulido A, Zarco L, Galina CS, Murcia C, Flores G and Posadas E. Progesterone metabolism during storage of blood samples from Gyr cattle: Effects of anticoagulant, time and temperature of incubation. *Theriogenology* 1991;35(5):965-975.
79. Richards JS, Russell DL, Robker RL, Dajee M and Alliston TN. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1998; 145: 47-54.
80. Schams D and Berisha B. Regulation of corpus luteum function in cattle – an overview. *Reproduction in Domestic Animals* 2004;39:241-251.
81. Schindler A. Endocrinology of pregnancy: Consequences for the diagnosis and treatment of pregnancy disorders. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2005;97:386-388.
82. Schneider F, Heilel B, Alm H, Torner H, Becker F, Viergutz T, Nürnberg G Kanitz W. Endocrine, morphological, and cytological effects of a depot GnRH agonist in bovine. *Animal Reproduction Science* 2006;92:9-28.
83. Schuler LA, Nagel RJ, Gao J, Horseman N, Kessler M. Prolactin receptor heterogeneity in bovine fetal and maternal tissues. *Endocrinology* 1997;138(8):3187-3194.
84. Senger PL, Editor. *Pathways to the pregnancy and parturition*. 2nd Ed. Washington: Current Conceptions, Inc., 2003.
85. Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bazer, FW. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: Insights from domestic animals. *Biology of Reproduction* 2004;71:2-10.

86. Taverne MA, Breeveld-Dwarkasing VNA, Dissel-Emiliani FMF Van, Bevers MM, Jong R de Weijden GC Van der. Between prepartum luteolysis and onset of expulsión. *Domestic Animal Endocrinology* 2002;23:329-337.
87. Thatcher WW, MacMillan KL, Hansen PJ and Drost M. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* 1989;31:149-161.
88. Vizcarra JA, Wettemann RP, Braden TD, Turzillo AM and Nett TM. Effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on serum and pituitary concentrations of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone, GnRH receptors, and messenger ribonucleic acid for gonadotropin subunits in cows. *Endocrinology* 1997;138(2):594-601.
89. Webb R, Woad KJ, Armstrong DG. Corpus luteum (CL) function: Local control mechanism. *Domestic Animal Endocrinology* 2002;23:277-285.
90. Wiltbank MC, Wiepz GJ, Knickerbocker J, Braden TD, Sawyer HR, Mayan MH and Niswender GD. Cellular regulation of corpus luteum function during maternal recognition of pregnancy. *Reproduction and Fertility Development* 1992;4:341-7.
91. Yuan W and Lucy MC. Effects of growth hormone, prolactin, insuline-like growth factors, and gonadotropins on progesterone secretion by porcine luteal cells. *Journal of Animal Science* 1996;74:866-872.