



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EFFECTO DEL CLOPROSTENOL SOBRE LA FUNCIÓN LÚTEA Y
VIABILIDAD FETAL EN YEGUAS GESTANTES CON FETO MULA Y
FETO CABALLO EN ETAPAS TEMPRANAS DE LA GESTACIÓN

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Gilberto Flores Flores

Tutor:

Luís Alberto Zarco Quintero

Comité Tutorial:

Carlos Guillermo Gutiérrez Aguilar

Héctor Raymundo Vera Ávila



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.

DECLARACIÓN

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

La Maestría de Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

El autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número de registro 204648.

Este trabajo fue financiado con el proyecto PAPIIT (221206) "Pérdida de la función lútea como causa de aborto en yeguas utilizadas para la producción de mulas".

Gilberto Flores Flores

DEDICATORIAS

A Dios
A mi Sangre
A la UAZ y a la UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

A los laboratorios Intervet por el apoyo en los fármacos hormonales utilizados para este trabajo.

Al Dr. Luís Alberto Zarco Quintero, con el mas profundo agradecimiento por la paciencia, el apoyo, la confianza, el respeto y la amistad conferida a mi persona.

A los miembros de mi comité tutorial: Carlos Guillermo Gutiérrez Aguilar y Héctor Raymundo Vera Ávila, por los consejos y opiniones acertadas a lo largo de este trabajo.

A la Dra. Ana Myriam Boeta Acosta, por enseñarme a ser independiente y a tomar decisiones.

Al presbítero Gabriel Medina por el préstamo de su burro Kentucky, sin el cuál no hubiese posible el desarrollo del experimento.

Al MVZ José Saturnino Pineda por el acopio y préstamo de los animales utilizados.

A Clara Murcia, Ana Delia Rodríguez y Susana Rojas por su invaluable ayuda para determinar las concentraciones hormonales descritas en este trabajo.

A mis amigos, amigas y gente que me ha demostrado su cariño y amor a lo largo de mi vida en todos los lugares donde he tenido la oportunidad de vivir. Distrito Federal, Nayarit, Jalpa y Zacatecas.

Mas vale una palida tinta que una brillante memoria, así que deseo agradecer con este parrafo a todos mis compañeros, maestros y amigos del departamento de Reproducción y del departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Équidos de la FMVZ – UNAM.

Sin el deseo de cometer una grosería al omitir el nombre de todas las personas que he tenido la suerte de conocer, espero que todos los que son mis amigos consideren este parrafo dedicado especialmente a cada uno de ustedes.

RESUMEN

Efecto del cloprostenol sobre la función lútea y viabilidad fetal en yeguas gestantes con feto mula y feto caballo en etapas tempranas de la gestación Flores G, Zarco L, Gutierrez CG, Vera HR

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos de la administración de PGF2 α sintética durante el segundo mes de la gestación sobre la función lútea y viabilidad fetal en yeguas gestantes con feto mula y yeguas gestantes con feto equino, relacionando dichos efectos con las concentraciones de eCG y progesterona presentes al momento de administrar la PGF2 α . Se utilizaron 21 yeguas gestantes, 9 con embrión equino y 12 con embrión mula. Al llegar al día 65 en promedio de la gestación se le administró 0.25 mg de PGF2 α sintética (Cloprostenol) por vía IM al Grupo Equino-PGF2 α , (n=4) y al Grupo Burro-PGF2 α (n=6). Los tratamientos se repitieron a las 48 h, y a partir de este momento se repitió la dosis cada 24 h hasta que se registrara la expulsión del producto. Los otros animales de los grupos testigo (Equino-SSF y Burro-SSF) recibieron 1 ml de solución salina fisiológica, repitiéndose la dosis a las 48 h de la primera aplicación y a partir de este momento se repitió la dosis cada 24 h durante tres días. Se obtuvieron muestras de sangre de todas las yeguas para determinar las concentraciones de progesterona y eCG conforme la aplicación de los tratamientos. Se realizaron seguimientos ultrasonográficos para determinar la viabilidad fetal (latido cardíaco y/o movimiento fetal) hasta el momento de la expulsión. Las concentraciones promedio de eCG y Progesterona siempre fueron menores ($p < 0.05$) en las yeguas del grupo Burro-PGF2 α que en las del grupo Equino-PGF2 α . Las yeguas del grupo Burro-PGF2 α no presentaron niveles significativamente menores a 1ng/ml, muerte fetal y aborto del producto mas tempranamente que las yeguas del grupo Equino-PGF2 α , aunque siempre siguieron un comportamiento de llegar a ser estadísticamente diferentes puesto que los valores siempre fueron mayores en este ultimo grupo.

Se concluye que las reducidas concentraciones de eCG presentes en las yeguas gestantes con feto mula resultan en una mayor susceptibilidad de los cuerpos lúteos de la gestación al efecto luteolítico de la PGF2 α , por lo que una sola inyección provoca el cese casi total de la función lútea, mientras que en las yeguas gestantes con feto equino se requieren la administración repetida de la hormona antes de que los cuerpos lúteos dejen de producir cantidades significativas de progesterona. Como resultado de lo anterior, la muerte fetal y la expulsión del producto tienden a ocurrir antes en las yeguas gestantes con feto mula.

Palabras clave: Cloprostenol, PGF2 α , eCG, progesterona, equino, mula, feto.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of the application of synthetic PGF₂α during the second month of pregnancy over the luteal function and fetal viability in mares pregnant with mule fetos and mares pregnant with equine fetos, relating these effects with the concentrations of eCG and Progesterone present in the moment of the application of the PGF₂α. A total of 21 pregnant mares were used in this experiment, 9 mares pregnant with equine embryos and 12 mares pregnant with mule embryos. In average, at day 65 of gestation, 0.25mg of synthetic PGF₂α (Cloprostenol) were applied IM to the group Equine-PGF₂α (n=4) and to the group Donkey-PGF₂α (n=6). The treatments were repeated at the 48 h, and since this moment the dose were repeated every 24 h until the abortion of the product. The other animals of the groups that served as control (Equine-SSF and Donkey-SSF) received 1ml of physiologic saline solution, repeating the dose at the 48 h of the first application and since this moment the dose was repeated every 24 h for three days. Blood samples were collected from all the mares to determine Progesterone and eCG concentrations before each applications of the treatments. Ultrasonographic evaluations were performed to determine the fetal viability (Heart beat and/or fetal movement) until the moment of the abortion. The average eCG and Progesterone concentrations were always lower ($p < 0.005$) in the mares of the group Donkey-PGF₂α compared to the mares of the group Equine-PGF₂α. The mares of the group Donkey-PGF₂α did not had levels significantly lower to 1ng/ml, fetal death and abortion earlier than the mares of the group Equine-PGF₂α, even that always followed a tendency to become statistically different due to the values were always bigger in the group Equine-PGF₂α.

It is concluded that the reduced concentrations of eCG present in the mares pregnant with mule fetuses cause corpus luteums more susceptible to luteolysis by the effect of the PGF₂α, indicating that one injection cause the cessation almost complete of the luteal function, while the mares pregnant with equine fetuses require the continuous administration in several times of the hormone to produce the cessation of the corpus luteum to produce significative quantities of progesterone

As a result of this, the fetal death and the abortion have the tendency to occur before in the mares pregnant with mule fetuses.

Key Words: Cloprostenol, PGF₂α, eCG, progesterone, equine, mule, fetus.

CONTENIDO	Página
DECLARACION	I
DEDICATORIAS	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2.HIPOTESIS	3
3. OBJETIVOS	3
4. REVISION DE LITERATURA	4
4.1 Función lutea	4
4.1.1 Producción de progesterona	4
4.1.2 Funciones de la progesterona	7
4.2 Prostaglandinas	8
4.2.1 Papel luteolítico de la PgF2 α	9
4.2.2 Inducción de la luteolisis con PgF2 α	12
4.3 Fisiología de la gestación temprana	13
4.4 La función lutea durante la gestación y su relación con la eCG	16
4.5 Gonadotropina Coriónica equina	17
4.5.1 Copas endometriales	18
4.5.2 Estructura de la eCG	20
4.5.3 Actividad biológica de la eCG	22
4.5.4 Secreción de la eCG	23
4.5.5 Persistencia de la eCG	24
4.5.6 Función de la eCG en equidos	25
4.5.7 Función luteotrópica de la eCG	26
4.6 Gestaciones intraespecie e interespecie	28
4.7 Resistencia a la PgF2 α en la yegua gestante	31
4.8 Métodos para la determinación de la viabilidad fetal	32

5. MATERIAL Y MÉTODOS	34
6. RESULTADOS	37
7. DISCUSIÓN	43
8. CONCLUSION	47
9. LITERATURA CITADA	48

INDICE DE FIGURAS

No	Descripción	Página
FIGURA 1	Concentraciones de eCG inmediatamente antes (hora 0) y a diversos intervalos después del primer tratamiento con 0.25 mg de PGF2 α sintética (cloprostenol) o con 1 ml de SSF en yeguas gestantes con caballo y yeguas gestantes con burro. ^{a,b} Literales diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.01$).	37
FIGURA 2	Concentraciones de Progesterona en yeguas gestantes con burro y yeguas gestantes con caballo en diferentes momentos en relación a la administración de 1 ml de SSF (hora 0). Nótese el cambio de escala de tiempo a partir de las 48 h. ^{a,b} Literales diferentes indican que las dos curvas son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) Las flechas indican el momento de administración de la SSF.	38
FIGURA 3	Concentraciones de progesterona en yeguas gestantes con caballo en diferentes momentos en relación a la administración de 0.25 mg de PGF2 α sintética o 1 ml de SSF (hora 0). Nótese el cambio de escala de tiempo a partir de las 48 h. El momento a partir del cual las concentraciones de progesterona fueron significativamente ($p < 0.05$) menores en el grupo tratado con Equino-PGF2 que en el grupo Equino-SSF se indica con *. El momento en el que las concentraciones de progesterona dejaron de ser significativamente diferentes a 0 ng/ml se indica con **. Las flechas indican el momento de administración de PGF2 α (Cloprostenol).	39
FIGURA 4	Concentraciones de progesterona en yeguas gestantes con burro en diferentes momentos en relación a la administración de 0.25 mg de PGF2 α sintética o 1 ml de SSF (hora 0). Nótese el cambio de escala de tiempo a partir de las 48 h. El momento a partir del cual las concentraciones de progesterona fueron significativamente ($p < 0.05$) menores en el grupo tratado con Equino-PGF2 que en el grupo Equino-SSF se indica con *. El momento en el que las concentraciones de progesterona dejaron de ser significativamente diferentes a 0 ng/ml se indica con **. **. Las flechas indican el momento de administración de PGF2 α (Cloprostenol) y/o SSF.	40

- FIGURA 5 Concentraciones de progesterona en yeguas gestantes con burro y yeguas gestantes con caballo en diferentes momentos en relación a la administración de 0.25 mg de PGF2 α sintética. Nótese el cambio de escala de tiempo a partir de las 48 h. El momento a partir del cual las concentraciones de progesterona dejaron de ser significativamente diferentes a 0 ng/ml en cada grupo se indica con **. Las flechas indican el momento de administración de PGF2 α (Cloprostenol) 41
- FIGURA 6 Intervalos entre la primera inyección de PGF2 α y diversos eventos en yeguas gestantes con caballo y yeguas gestantes con burro tratadas con PGF2 α 42
- FIGURA 7 Concentraciones de sulfato de estrona en diversos momentos después de la administración de PGF2 α o SSF a yeguas gestantes con caballo o yeguas gestantes con burro. 42

1. INTRODUCCIÓN

A partir del día 35 de la gestación en la yegua, las células especializadas que rodean una parte del corion llamada cinturón coriónico, invaden al endometrio materno, fagocitan células endometriales, y crean estructuras nuevas llamadas copas endometriales, en las que se producen cantidades considerables de una hormona glicoprotéica denominada gonadotropina coriónica equina (eCG) (Allen 1982). La eCG tiene acciones similares a las de la hormona luteinizante (LH), incluyendo la capacidad de provocar la ovulación de folículos preovulatorios y la de estimular la esteroidogénesis en el cuerpo lúteo. Por ésta razón, a partir del día 35 de la gestación puede ocurrir la ovulación de folículos que se desarrollan periódicamente por efecto de la hormona folículo estimulante (FSH), y que antes del día 35 no llegaban a ovular debido a los bajos niveles de LH presentes durante la gestación (Allen, 1993). Cada vez que ovula un folículo durante la gestación se forma una estructura denominada cuerpo lúteo accesorio, el cual se une al cuerpo lúteo original de la gestación, colaborando con él en la producción de progesterona para mantener la gestación.

La formación de los cuerpos lúteos accesorios es un proceso gradual que es soportado por la secreción continua de eCG (Allen, 1982) entre el segundo y el quinto mes de la gestación equina. Además de su papel en la formación de cuerpos lúteos accesorios, la eCG estimula tanto al cuerpo lúteo primario como a los secundarios para que mantengan la secreción de progesterona hasta el día 150 a 180 de gestación, cuando todos ellos sufren regresión debido a un rechazo inmunológico de las copas endometriales por parte de la madre, lo que resulta en el cese de la producción de eCG (Squires *et al.*, 1974).

En las gestaciones híbridas, resultado de la cruce de una yegua con un burro (embrión mula), las copas endometriales presentan un desarrollo menor y una producción mas reducida de eCG, además de ser destruidas en forma más temprana (Allen, 1993), por lo que las concentraciones de eCG en la circulación materna se elevan muy poco y sólo por unas cuantas semanas,

desapareciendo generalmente de la circulación entre el día 55 y el día 70 de la gestación (Boeta y Zarco, 2005; Boeta, 2008). Como resultado de la falta de soporte gonadotrópico, a partir de la sexta semana de la gestación las concentraciones de progesterona en la yegua gestante con burro son significativamente menores que en las yeguas gestantes con caballo (Allen, 1993; Boeta y Zarco, 2005; Boeta, 2008).

Se sabe que durante la gestación intraespecie (embrión equino), los cuerpos lúteos de la gestación son altamente resistentes a los efectos luteolíticos de la prostaglandina F₂α (PGF₂α), y se asume que esto se debe a los efectos luteotrópicos de la eCG. Así, cuando la PGF₂α se administra en la etapa del diestro se produce una disminución significativa en las concentraciones de progesterona durante las primeras 12 horas, y una caída a niveles basales a las 24 horas. Lo mismo ocurre cuando la PGF₂α se administra a yeguas que se encuentran en los primeros 32 días de la gestación, en las que una sola dosis de PGF₂α resulta en la inducción del aborto. En cambio, en el segundo tercio de la gestación se requieren múltiples administraciones (Douglas *et al.*, 1974) o dosis más elevadas (Douglas *et al.*, 1979; Daels *et al.*, 1995) para inducir la pérdida de la gestación.

Se ha propuesto que después del día 40 de gestación, la eCG es la encargada de la protección de las yeguas gestantes ante los efectos luteolíticos de la PGF₂α (Allen, 2001), y que este efecto protector no estaría presente en las yeguas gestantes con feto mula (Boeta, 2008), es posible entonces que el alto índice de abortos que se produce en las gestaciones interespecie (Boeta y Zarco, 2005; Boeta, 2008) se deba a los bajos niveles de eCG, que no serían suficientes para proteger a los cuerpos lúteos de la gestación en caso de una producción endógena de PGF₂α, como la que puede ocurrir cuando un animal sufre síndrome abdominal agudo, laminitis o en presencia de endotoxinas (Neely, 1979).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto luteotrópico de la eCG en gestaciones con feto equino y con feto mula, la administración de

PGF₂α sintética requerida para inducir la luteolisis y provocar el aborto en los días 65 a 75 de la gestación de yeguas gestantes con feto equino (servidas con caballo) y yeguas gestantes con feto mula (servidas con burro) relacionando estos resultados con las concentraciones de eCG y de progesterona circulantes antes de iniciar los tratamientos.

2. HIPÓTESIS

Debido a sus menores concentraciones de eCG, las yeguas gestantes con feto mula son más susceptibles que las yeguas gestantes con feto equino a la luteolisis y al aborto provocados por la administración de PGF2 α sintética durante el segundo mes de la gestación

3. OBJETIVOS

Evaluar los efectos de la administración de PGF2 α sintética durante el segundo mes de la gestación sobre la función lútea y viabilidad fetal en yeguas gestantes con feto mula y yeguas gestantes con feto equino, relacionando dichos efectos con las concentraciones de eCG y progesterona presentes al momento de administrar la PGF2 α .

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 FUNCIÓN LÚTEA

El cuerpo lúteo (CL) es una glándula endocrina transitoria que se desarrolla después de la ovulación a partir de la diferenciación y proliferación de las células foliculares. (Diaz *et al.*, 2002).

El CL maduro está compuesto por al menos dos tipos de células esteroidogénicas con base en criterios morfológicos y bioquímicos (Niswender *et al.*, 2000). Estas células son conocidas como células lúteas pequeñas y células lúteas grandes. Además, en el CL existen otras células sin potencial esteroidogénico, como los fibroblastos, células endoteliales y células inmunes. El rápido crecimiento del cuerpo lúteo a partir de la ovulación solamente es equiparable con el ritmo de crecimiento de los tumores más agresivos (Webb *et al.*, 2002).

4.1.1 PRODUCCIÓN DE PROGESTERONA

En el folículo ovárico las células de la teca expresan las enzimas necesarias para convertir el colesterol en andrógenos, pero carecen de las enzimas necesarias para convertir los andrógenos en estradiol. (Bao *et al.*, 1998). Sin embargo, las células de la granulosa tienen la capacidad convertir andrógenos en estradiol, por lo que los andrógenos producidos por la teca son aromatizados a estradiol por las células de la granulosa (Richards *et al.*, 1987).

La oleada preovulatoria de LH provoca la luteinización de las células de la granulosa y de la teca, alterando la vía esteroidogénica de forma tal que después de la luteinización tanto las células de la teca como las de la granulosa producen principalmente progesterona. (Niswender *et al.*, 2000). La producción de progesterona utiliza pocas enzimas y es considerada como la vía esteroidogénica más simple. Al igual que en otras células esteroidogénicas, en el CL el colesterol puede obtenerse a partir de

lipoproteínas circulantes, de las reservas intracelulares de ésteres de colesterol, o por medio de la biosíntesis de colesterol *de novo* (Strauss *et al.*, 1981).

La producción de progesterona por el CL es estimulada o mantenida por varias hormonas luteotrópicas, siendo la principal la hormona luteinizante (LH), con la colaboración de otras hormonas como la prolactina y el estradiol (Díaz *et al.*, 2002).

Las células lúteas derivadas de la teca y de la granulosa dan origen a dos tipos celulares distintos, que difieren morfológica y fisiológicamente. Las células derivadas principalmente de células de la granulosa han sido designadas como células lúteas grandes (LLC) y las derivadas de las células tecales han sido designadas como células lúteas pequeñas (SLC) (Niswender *et al.*, 2000).

La diferenciación de las células de la teca y de la granulosa en células capaces de producir grandes cantidades de progesterona se acompaña por un aumento en la expresión de las enzimas involucradas en la conversión de colesterol a progesterona, como el complejo citocromo P-450 de segmentación de la cadena lateral de colesterol (P-450 scc) y la 3 β Hidroxiesteroide deshidrogenasa $\Delta^5\Delta^4$ isomerasa (3 β - HSD). Al mismo tiempo se produce una disminución en la expresión de las enzimas encargadas de los diversos pasos de la transformación de progesterona en estrógenos, por ejemplo la citocromo P450 17 α hidroxilasa y la citocromo P-450 aromatasa (Bao *et al.*, 1998).

La mayoría del colesterol usado en la esteroidogénesis se obtiene de la sangre en forma de lipoproteínas de alta (HDL) o baja (LDL) densidad (Grummer *et al.*, 1988).

El colesterol es una molécula hidrofóbica, por lo que le es difícil que difunda libremente a través de ambientes hidrofílicos como el del citoplasma.

Por lo que el movimiento de colesterol en la circulación o dentro de la célula es a través de proteínas de transporte (Diaz *et al.*, 2002).

La captación de las LDL por las células lúteas ocurre por endocitosis mediada por receptores. Una vez internalizados, los endosomas se combinan con lisosomas, donde la LDL se disocia de su receptor y es degradada, dejando colesterol libre disponible para la célula (Grummer *et al.*, 1988). El receptor LDL se incrementa dramáticamente después de la luteinización de las células de la granulosa tanto *in Vitro* como *in Vivo* (Rajapaksha *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998).

Una vez que el colesterol libre está en el citosol de la célula puede usarse directamente para la esteroidogénesis o para la incorporación en membranas celulares, o puede ser esterificado con ácidos grasos para formar ésteres de colesterol y ser almacenado (Lestavel *et al.*, 1994).

Cuando se requiere colesterol, la colesterol esterasa hidroliza los ésteres de colesterol almacenados y los deja libres para su uso por la célula. Este es uno de los pasos en la esteroidogénesis que está controlado de manera precisa por vías de segundo mensajero. La colesterol esterasa es activada cuando es fosforilada por la proteína cinasa A (PKA) (Trzeciak *et al.*, 1974).

La síntesis de todos los esteroides depende del transporte del colesterol al interior de la mitocondria. Para estar disponible para la esteroidogénesis el colesterol debe ingresar a la cara interna de la membrana mitocondrial interna, donde reside el complejo enzimático colesterol P450-*scc*, que segmenta la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona (Niswender *et al.*, 2000).

La estimulación de la esteroidogénesis por hormonas trópicas mejora el transporte del colesterol a la mitocondria, lo que es un proceso complicado que no se explica por la simple difusión del colesterol a través de la membrana mitocondrial. El paso limitante en la vía esteroidogénica es el transporte del colesterol de la membrana mitocondrial externa a la interna.

Este paso también parece ser el sitio principal de regulación positiva y negativa de la esteroidogénesis por sistemas de segundos mensajero (Simpson *et al.*, 1983)

La principal limitante en la producción de progesterona lútea es el transporte del colesterol al interior de la membrana mitocondrial, lo que es mediado por la proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis (StAR). La activación de la PKA aumenta la cantidad de StAR fosforilada, lo que estimula el transporte de colesterol (Pon *et al.*, 1986). De esta manera la fosforilación de la StAR con la resultante elevación del transporte de colesterol parece ser un paso clave en la estimulación hormonal aguda de la síntesis de progesterona (Wiltbank *et al.*, 1993).

Una vez transportado el colesterol a la matriz mitocondrial entran en juego las acciones de la P450 SCC, la drenodoxina y la adrenodoxina reductasa, que rompen la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona. Posteriormente la pregnenolona se difunde hacia el exterior de la mitocondria y hacia el retículo endoplásmico rugoso, donde es transformada en progesterona por la enzima 3β hidroxisteroide deshidrogenasa Δ^5 - Δ^4 isomerasa (β HSD). De aquí la progesterona difunde hacia fuera de la célula lútea y al torrente sanguíneo (Couet *et al.*, 1990; Diaz *et al.*, 2002)

Las células lúteas pequeñas y grandes difieren en sus tasas basales de secreción de progesterona, produciendo las grandes de 2 a 40 veces más progesterona que las células pequeñas sin estimular (Niswender *et al.*, 1994)

4.1.2 FUNCIONES DE LA PROGESTERONA

Los blancos principales de la progesterona son el aparato reproductivo y el eje hipotálamo – hipófisis (Niswender *et al.*, 2000). En el útero, la progesterona induce la inactividad del miometrio. Esto se manifiesta como un aumento del potencial de reposo de las células miometriales, además de una reducción en el acoplamiento eléctrico entre las células miometriales; ya que

la progesterona disminuye el ingreso del calcio a la célula, requerido para la contracción de las células miometriales (Batra, 1986). Por otra parte, la progesterona bloquea la capacidad del estradiol para estimular la aparición de receptores adrenérgicos, cuya activación causa contracciones uterinas (Niswender, 2000).

La progesterona también induce la diferenciación del estroma uterino, estimulando las secreciones glandulares en asociación con la acumulación de las vacuolas basales en el epitelio glandular, y cambiando el patrón de las proteínas secretadas por las células endometriales. (Maslar *et al.*, 1986), las que proporcionan un ambiente que favorece el desarrollo embrionario temprano (Strinden *et al.*, 1983).

4.2 PROSTAGLANDINAS

Los eicosanoides son metabolitos oxigenados de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Los eicosanoides derivados del ácido araquidónico incluyen a las prostaglandinas, los tromboxanos, los leucotrienos y las lipoxinas, todos los cuales actúan como señales de comunicación intercelular local entre tipos celulares específicos (Silvia, 1999).

La prostaglandina de mayor interés en la reproducción animal es la prostaglandina F2 alfa (PGF₂α), la cual se deriva del ácido araquidónico que es liberado a partir de los fosfolípidos membranales de varias células en respuesta a estímulos endócrinos, nerviosos y/o físicos.

La hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana celular para liberar ácido araquidónico es una reacción enzimática mediada por la fosfolipasa A. El ácido araquidónico libre es el precursor de las prostaglandinas y tromboxanos sintetizados por medio de la vía de la ciclo oxigenasa, además de los leucotrienos; sintetizados por medio de la vía de la lipooxigenasa.

La prostaglandina sintetasa es un complejo enzimático microsomal que convierte el ácido araquidónico en PGH₂, que es el precursor de todas las

prostaglandinas. En un primer paso, el ácido araquidónico es transformado en endoperóxido (PGG₂) por medio de la ciclo oxigenasa. La prostaglandina G₂ se convierte de inmediato en PGH₂ por medio de una peroxidasa. Posteriormente, la PGH₂ puede ser reducida a PGF₂α por la reductasa de prostaglandinas, o bien ser convertida por medio de otras enzimas en alguna otra sustancia activa (PGE₂, tromboxanos, prostaciclina; Samuelsson, 1981).

Las prostaglandinas producidas en forma endógena son rápidamente metabolizadas en la circulación. Debido a que la PGF₂α desaparece muy rápido de la circulación se ha aceptado que la determinación de su principal metabolito, 15-ceto-13,14-dihidro PGF₂α, es el método más confiable para estimar la secreción endógena de PGF₂α (Haluska y Currie, 1988).

4.2.1 PAPEL LUTEOLÍTICO DE LA PGF₂α

En la mayoría de las especies la destrucción del cuerpo lúteo (luteolisis) que se produce al final de la fase lútea en las hembras que no están gestantes es provocada por PGF₂α de origen uterino (Phariss *et al*, 1970; Niswender, 2000). Al final de la fase lútea en la hembra vacía se establece un patrón pulsátil de secreción de PGF₂α (Zarco *et al*, 1998) que provoca primero una reducción en la secreción de progesterona (McGuire *et al*, 1994), lo que es seguido por la muerte de las células lúteas y la destrucción física del CL (Pate *et al*, 1994). En yeguas, como en otras especies animales, la secreción uterina pulsátil de PGF₂α es responsable de la regresión del CL que ocurre al terminar el periodo de diestro (Starbuck, 1998).

En las yeguas, la arteria ovárica no se encuentra íntimamente asociada a la vena utero-ovárica como ocurre en rumiantes, por lo que la PGF₂α debe viajar a través de la circulación general antes de llegar al ovario que contiene al cuerpo lúteo (Vanderwall *et al*, 2000). Debido a que la PGF₂α debe actuar a través de la circulación sistémica, se cree que el cuerpo lúteo de la yegua es extremadamente sensible a niveles muy bajos de PGF₂α circulantes (Vanderwall *et al*, 2000). En efecto, se ha demostrado que la afinidad de

unión de la PGF2 α a sus receptores membranales en el cuerpo lúteo es 10 veces mayor en las yeguas que en las vacas (Vernon *et al.*, 1979).

En las yeguas no gestantes, el periodo de vida del cuerpo lúteo es controlado por la liberación de PGF2 α por el endometrio entre los días 13 y 16 después de la ovulación. La primera liberación de PGF2 α precede a la primera disminución en las concentraciones de progesterona por aproximadamente 3 a 4 h, lo cual es seguido por una liberación más fuerte de PGF2 α durante la luteolisis (Stabenfeldt *et al.*, 1981)

Aunque los mecanismos que regulan la secreción uterina de PGF2 α en yeguas no están totalmente entendidos, en rumiantes domésticos se ha demostrado que la liberación inicial de PGF2 α por el endometrio es inducida por la acción de la oxitocina, probablemente de origen neurohipofisario, sobre los receptores endometriales de oxitocina (McCracken *et al.*, 1991). A su vez, la PGF2 α estimula la secreción de oxitocina por parte del cuerpo lúteo (Flint y Sheldrick, 1982) creando una reacción de retroalimentación positiva que incrementa la magnitud del pulso de PGF2 α .

Existe evidencia de que la oxitocina también está involucrada en el proceso luteolítico en la yegua, ya que la administración de oxitocina exógena estimula la liberación de PGF2 α durante el diestro tardío (Betteridge *et al.*, 1985), y las concentraciones de oxitocina se encuentran altas en este momento (Stevenson *et al.*, 1991). Por esta razón se ha sugerido que la oxitocina es responsable de estimular la liberación episódica de PGF2 α del endometrio durante la luteolisis de la yegua (Starbuck *et al.*, 1998).

La caída inicial en la secreción de progesterona probablemente se debe a una disminución en el flujo sanguíneo del cuerpo lúteo, lo que priva a la glándula de nutrientes y sustratos (Phariss *et al.*, 1970; Azmi *et al.*, 1984). Esto es seguido por un descenso en la capacidad esteroideogénica de cada una de las células lúteas (Niswender, 2000).

La PGF2 α estimula a las células endoteliales del cuerpo lúteo para producir endotelina-1. La potente actividad vasoconstrictora de esta sustancia provoca una reducción del flujo sanguíneo durante la luteolisis temprana, y la hipoxia resultante puede causar liberación adicional de endotelina-1 (Girsh *et al.*, 1996).

Entre las 24 y 36 horas de exposición a la PGF2 α , las células lúteas no sufren cambios morfológicos evidentes, pero su capacidad esteroidogénica ha sido reducida apreciablemente (Sawyer *et al.*, 1990).

La PGF2 α actúa uniéndose a receptores específicos localizados en células lúteas esteroidogénicas grandes. Estos pertenecen a la familia de receptores transmembranales acoplados a proteína G. Al unirse con alta afinidad a sus receptores, la PGF2 α induce la activación de la enzima fosfolipasa C, la cual cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato a inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) y 1,2 diacilglicerol (DAG). El IP3 se difunde en el citoplasma hasta unirse a receptores de la membrana del retículo endoplásmico, provocando una despolarización de la misma que resulta en la liberación hacia el citoplasma del Ca $^{++}$ almacenado en el retículo endoplásmico. El aumento de Ca $^{++}$ libre y el DAG (localizada en la membrana plasmática), estimula la actividad de la proteína cinasa dependiente de Ca $^{++}$ (PKC; Niswender, 2000). La activación de la PKC provoca la fosforilación de diversas proteínas celulares involucradas en la esteroidogénesis, disponibilidad de colesterol y mantenimiento de la matriz extracelular, además de que induce la expresión y activación de proteínas involucradas en la apoptosis (Niswender *et al.*, 2000).

Un signo característico de la luteolisis es la disminución en la producción de progesterona lútea asociada a una disminución de la expresión de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR). Esta proteína es un regulador de la esteroidogénesis al transportar el colesterol hacia el interior de la membrana mitocondrial interna (Watson *et al.*, 2000). El tratamiento con PGF2 α en yeguas resulta en una disminución en las concentraciones de mRNA para StAR en el tejido lúteo. La disminución de mRNA- StAR después

de la administración de PGF2 α está asociada a la disminución tanto de las concentraciones de progesterona circulante como de la concentración intralútea de mRNA para el receptor de LH (LHr; Beg *et al.*, 2005), lo que coincide con la observación de que el número de receptores para LH disminuye junto con la disminución en las concentraciones de progesterona lútea y sérica durante la luteolisis natural e inducida por PGF2 α (Roser *et al.*, 1982; Roser & Evans, 1983).

4.2.2 INDUCCIÓN DE LUTEOLISIS CON PGF2 α

En las yeguas en diestro es posible provocar la luteolisis mediante la administración de 5 mg de PGF2 α natural (Nelson, 1976). El cuerpo hemorrágico en desarrollo es refractario a la lisis por medio de prostaglandinas durante los primeros 4 o 5 días posteriores a la ovulación (Paccamonti, 1991), por lo que la PGF2 α tiene un efecto luteolítico significativo solamente sobre los CL maduros (Keifer *et al.*, 1979; Bristol, 1987).

Después del tratamiento con PGF2 α existe una disminución dramática y abrupta en las concentraciones del mRNA para la enzima 3 β HSD (65% a las 4h; 85% a las 12h). Sin embargo, el mRNA para la enzima P450scc y la actividad enzimática de la 3 β HSD sólo disminuyen hasta 24 h después del tratamiento con PGF2 α (Hawkins *et al.*, 1993; Juengel *et al.*, 1995; Tsai, 2001). La progesterona circulante decrece significativamente en las primeras 12 h después del tratamiento con PGF2 α , lo que coincide con la disminución en las concentraciones de mRNA para enzimas esteroidogénicas dentro del tejido lúteo, con una disminución en las concentraciones de mRNA para receptores de LH y para la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda StAR (Beg *et al.*, 2005).

La inducción de la síntesis intralútea de PGF2 α en respuesta a la PGF2 α extralútea puede ser crítica para completar el proceso luteolítico. (Beg *et al.*, 2005). Así, se ha demostrado que los tratamientos con PGF2 α exógena

incrementa la actividad de la ciclooxigenasa, una enzima clave en el patrón de biosíntesis de prostaglandinas (Tsai y Wiltbank, 1997, 1998).

El tratamiento exógeno con $\text{PGF2}\alpha$ indujo un aumento de más de tres veces en el mRNA de la isoforma Cox-2 de la ciclooxigenasa en el cuerpo lúteo. Este hallazgo indica que las yeguas son similares a las especies bovina y ovina, en las que la $\text{PGF2}\alpha$ exógena induce la síntesis de $\text{PGF2}\alpha$ intralútea. (Beg *et al.*, 2005).

Los resultados indican que, en las yeguas, la $\text{PGF2}\alpha$ exógena y presumiblemente la $\text{PGF2}\alpha$ uterina inducen la síntesis intralútea de $\text{PGF2}\alpha$, y son compatibles con el establecimiento de una curva autocrina intralútea para amplificar y aumentar el efecto luteolítico de la $\text{PGF2}\alpha$. (Beg *et al.*, 2005). Esta propiedad de la $\text{PGF2}\alpha$, puede explicar el porqué a la mitad del diestro las dosis de $\text{PGF2}\alpha$, a pesar de ser considerablemente menores a las recomendadas por el fabricante (1.25mg / yegua) son efectivas para inducir una luteolisis completa (Barker *et al.*, 2006).

En la yegua la aplicación de $\text{PGF2}\alpha$ provoca algunos efectos indeseables, tales como sudoración y signos de cólico. Por eso es más recomendable utilizar un análogo sintético que conserva los efectos luteolíticos de la hormona con menor incidencia de efectos secundarios.

El cloprostenol es una prostaglandina F sintética usada en animales para inducir luteolisis, provocar abortos, y para el tratamiento de la piometra y la endometritis.

Químicamente el cloprostenol sódico se presenta como un polvo blanco o casi blanco, amorfo e higroscópico. El cloprostenol causa la regresión del cuerpo lúteo y detiene su actividad secretora. También tiene efectos estimulatorios directos sobre el músculo liso uterino, causando contracción y efectos relajantes del cervix. La dosis indicada en yeguas para causar luteolisis es de 100 microgramos (Alcántara *et al.*, 2005)

4.3 FISIOLÓGÍA DE LA GESTACIÓN TEMPRANA

El embrión equino tarda 6 días en recorrer la totalidad del oviducto, y entra al útero a través de la papila uterotubárica entre los días 6 y 7 posteriores a la ovulación (Battut *et al.*, 1998). Una característica especial de la gestación equina es que los óvulos no fertilizados son retenidos en la unión útero-tubárica, mientras que a los embriones sí se les permite el paso hacia el cuerno uterino, lo que al parecer se debe a que el embrión comienza a secretar cantidades apreciables de la hormona prostaglandina E₂ (PGE₂), cuando alcanza el estadio de mórula compacta, en el día 5 después de la ovulación (Weber *et al.*, 1991).

Entre los días 6 y 22 después de la ovulación el embrión equino está completamente envuelto por un glicocalix fuerte y elástico conocido como la cápsula equina (Betteridge, 1989). Esta cápsula está fuertemente adherida al embrión equino y evita que el trofoblasto se alargue entre los días 10 y 16 después de la ovulación. Por esta razón el embrión equino se mantiene esférico y completamente libre dentro del lumen uterino, donde se mueve constantemente a lo largo del útero impulsado por contracciones peristálticas del miometrio (Ginther, 1985).

El constante movimiento del embrión equino a través del útero entre los días 7 y 17 es necesario para asegurar que la señal de reconocimiento materno de la gestación producida por el embrión pueda entrar en contacto directo con el endometrio en toda la extensión del útero (Ginther, 1985).

El reconocimiento materno de la gestación se lleva a cabo entre los días 14 y 16 post-ovulación, aunque el embrión comienza su efecto luteoestático alrededor de los días 11 al 13 después de la ovulación (Betteridge *et al.*, 1985). El factor antiluteolítico de la gestación que permite el reconocimiento materno de la gestación suprime el reciclaje de receptores para oxitocina en el endometrio (Stout *et al.*, 2000), lo que no permite el establecimiento del patrón de secreción pulsátil de PGF₂α (Watson *et al.*, 1997).

Después de llevarse a cabo el reconocimiento de la gestación, el cuerpo lúteo de la yegua gestante permanece en los ovarios, pero declina gradualmente en su producción de progesterona durante los siguientes 20 días, hasta el punto en que las concentraciones periféricas de progesterona plasmática en la mayoría de las yeguas cae desde un pico en el diestro de 12 a 20 ng/ml entre el día 5 y 10 de ovulación, hasta niveles tan bajos como 3-5 ng/ml en el día 35 de la gestación. Sin embargo, una vez que se comienza a secretar eCG por parte de las copas endometriales, el cuerpo lúteo primario, aumenta tanto su tamaño como su ritmo de secreción de progesterona (Allen, 2001).

La cápsula equina acumula en su superficie una variedad de proteínas y otros componentes de las secreciones de las glándulas endometriales a medida que el embrión se mueve por el útero entre los días 7 y 17 después de la ovulación. Finalmente la cápsula equina comienza a desintegrarse alrededor del día 20-21 (Denker *et al.*, 1987). Esta desintegración permite el desarrollo de prolongaciones celulares en la superficie externa de la membrana coriovitelina, la cual todavía no está vascularizada. Estas prolongaciones se proyectan hacia el interior de las glándulas endometriales para quedar embebidas en las secreciones glandulares y para dar adherencia física al embrión en el endometrio (Allen, 2001).

En el día 21 postovulación se puede detectar latido cardíaco a través de ultrasonografía, en el polo ventral de la vesícula embrionaria que todavía conserva su forma esférica. En esta etapa el espacio por encima del embrión está ocupado por el saco vitelino. A partir del día 20 comienza a formarse el alantoides, que es una evaginación del intestino primitivo que aparece como un saco lleno de líquido localizado ventralmente al embrión, y que crece rápidamente hasta fusionarse con la parte ventral del corion hacia el día 28 (van Niekerk y Allen, 1975).

La fusión del alantoides y el corion ocasiona que se forme el corioalantoides, y en medio de estas capas se desarrolla el mesodermo vascular. Conforme el alantoides crece, llena el espacio situado por debajo

del embrión y el saco vitelino que se localiza dorsalmente al embrión va sufriendo regresión, por lo que el embrión, situado entre ambos sacos, va moviéndose gradualmente hacia el polo ventral de la vesícula embrionaria (Allen,1973). Hacia el día 35 de la gestación el embrión ha recorrido la mitad de este camino, por lo que se encuentra situado en la parte central de la vesícula embrionaria, con el saco vitelino por encima de él y el saco amniótico por debajo. Entre el día 30 y 35, en el área de corion localizada entre el alantoides y el saco vitelino se forma el cinturón coriónico, el cual es el precursor de las copas endometriales productoras de gonadotropina coriónica equina (Ginther, 1998).

Durante el primer mes de la gestación los ovarios de la madre continúan mostrando oleadas de crecimiento folicular cada 10 a 12 días, tal como sucede durante el ciclo estral. Estas oleadas son estimuladas por la liberación de FSH de origen hipofisiario (Urwin y Allen, 1982). Los folículos desarrollados en cada oleada no alcanzan la madurez ni ovulan debido a la retroalimentación negativa sobre la secreción de LH que ejerce la progesterona producida por el cuerpo lúteo de la gestación. Sin embargo, entre el día 38 y el día 40 en la mayoría de las yeguas gestantes se produce la ovulación de un folículo coincidiendo con el inicio de la secreción de eCG, que tiene actividad biológica similar a la de la LH (Daels *et al.*, 1991)

4.4 LA FUNCION LÚTEA DURANTE LA GESTACIÓN Y SU RELACIÓN CON LA eCG

Todos los mamíferos domésticos o silvestres que han sido investigados hasta la fecha requieren de progesterona o un metabolito biológicamente activo de la misma (5α pregnane-3,20 diona) para mantener la gestación. La progesterona o sus metabolitos activos inducen al endometrio a cumplir cambios estructurales y de intercambio gaseoso de la placenta (Steven y Samuel, 1975), estimulan a las glándulas endometriales a secretar nutrientes para el sustento del feto (Amoroso, 1952 citado por Allen, 2001). De la misma manera ayudan a mantener la quiescencia del miometrio (Pashen, 1984)

hasta el momento en que la madurez de los órganos del feto en crecimiento denoten su correcta preparación para el nacimiento (Rossdale y Silver, 1982).

Durante los primeros 3 meses de la gestación de la yegua, esta se mantiene por la progesterona secretada por las gónadas maternas. El CL primario es la fuente principal de progestágenos durante los primeros 40 – 50 días, y continúa contribuyendo con progesterona hasta su desaparición alrededor del día 120 – 150 de la gestación (Sharp, 1989).

Se asume que la función lútea es apoyada primariamente por la LH hipofisaria materna hasta los días 35 a 40 de la gestación (Ginther, 1992). A partir de ese momento la eCG comienza a secretarse y a tener actividad luteotrópica (Allen, 1980). Simultáneamente con la elevación en las concentraciones de eCG se ha observado un aumento en la secreción de progestágenos desde antes de que se formen CL secundarios, lo que sugiere que la eCG estimula directamente la esteroidogénesis del CL primario (Daels *et al.*, 1998). Además, ultrasonográficamente se ha observado que el CL primario aumenta de diámetro a partir del día 35 (Bergfelt *et al.*, 1989). Por otra parte se ha demostrado que la producción de progestágenos se incrementa durante la incubación con eCG de cortes de tejido de CL primarios y secundarios (Squires *et al.*, 1978). A este aumento de la producción de progestágenos acompañado por el incremento en el diámetro del CL se le ha referido como resurgencia del CL primario (Ginther, 1992).

Entre el día 40 y 150 de la gestación generalmente se desarrollan uno o varios cuerpos lúteos secundarios y/o suplementarios, los que proveen una fuente adicional de progesterona (Squires *et al.*, 1978; Martin *et al.*, 1989). Sin embargo no todas las yeguas gestantes desarrollan cuerpos lúteos secundarios, y su desarrollo en tiempo y número es extremadamente variable, sugiriendo que no son del todo esenciales para el desarrollo de la gestación. Después del día 160 de la gestación, tanto el cuerpo lúteo primario como los secundarios y/o suplementarios sufren regresión y a ese momento la gestación se mantiene por la secreción de progestágenos por parte de la unidad fetoplacentaria. Los metabolitos de la progesterona que circulan en

mayores concentraciones en la sangre materna son la 20α -hidroxi- 5α -pregnane-3-ona y el 5α -pregnane- 3β , 20α -diol.

4.5 GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA

En investigaciones realizadas se observó que el suero obtenido a partir de yeguas en diferentes estados de gestación estimulaba el crecimiento ovárico cuando se administraba a ratas prepúberes (Cole y Hart, 1930).

A la sustancia responsable de este efecto se le denominó inicialmente gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG). Inicialmente se asumió que se producía en la hipófisis de la madre pero el análisis de su localización en tejido materno y fetal ayudó a concluir que era secretada por el corion y almacenada en el endometrio (Catchpole y Lyons, 1934). Después se demostró que el sitio de síntesis de la gonadotropina de estudio, eran las copas endometriales (Clegg *et al.*, 1954).

Basado en el origen trofoblástico de las células que proliferan para formar las copas endometriales, se llegó a la conclusión de que el término gonadotropina coriónica equina (eCG) es más apropiado para describir a la glicoproteína producida por las copas endometriales.

La gonadotropina coriónica equina ha sido purificada en la yegua y la burra. La secuencia de aminoácidos no es idéntica en estas dos especies, por lo que recibe el nombre de acuerdo a su origen (eCG en la yegua y dCG en la burra; Clegg *et al.*, 1982). Los híbridos de estas especies también producen gonadotropinas coriónicas, aunque no se conoce si en estos se expresan tanto el alelo paterno como el materno o si existe impronta génica.

4.5.1 COPAS ENDOMETRIALES

Los tres principales eventos en la invasión endometrial son la adquisición de la capacidad invasiva de las células del cinturón coriónico, su migración

hacia el epitelio endometrial y su proliferación para formar las copas endometriales (Enders *et al.*, 1996).

Las células de las copas endometriales secretoras de eCG son realmente células del trofoblasto fetal que se originan a partir de una banda discreta anular de células hiperplásicas, denominada cinturón coriónico. El cinturón coriónico es una banda de tejido avascular especializado del trofoblasto que rodea la circunferencia del embrión (Ginther, 1979).

En el embrión equino el cinturón coriónico se desarrolla entre 25 y 34 días después de la ovulación en la región ecuatorial del embrión, en el punto de unión del saco vitelino en regresión con las membranas alantoideas en crecimiento (Allen y Moor, 1972). Las células de la superficie del cinturón comienzan a invadir el tejido materno, desplazándose vigorosamente y fagocitando a las células de la superficie endometrial y de la porción apical de las glándulas endometriales antes de pasar a través de las membranas basales para entrar al estroma uterino (Enders y Liu, 1991). Las células del cinturón coriónico equino tienen capacidades degradadoras de la matriz extracelular a través de la actividad de las metaloproteinasas. (Vagnoni *et al.*, 1995). Las células invasivas se unen a proteínas extracelulares de la matriz, secretando proteinasas capaces de degradar dichas estructuras y migrando a través de estas (Liotta *et al.*, 1986). El agresivo comportamiento invasivo de las células del cinturón coriónico equino es parecido al comportamiento del sincitiotrofoblasto del embrión humano o al de las células metastásicas de un tumor (Mignatti *et al.*, 1993).

Hacia el día 36 de la gestación las células logran migrar a través de la lámina basal hacia el interior del tejido intersticial del endometrio (Allen, 1973). En ese sitio completan su diferenciación, creciendo y adhiriéndose entre sí hasta formar las copas endometriales (Hamilton *et al.*, 1973).

Macroscópicamente las copas endometriales se describen como placas pálidas y bien delimitadas de tejido que se desarrollan en el endometrio del cuerno gestante del útero de la yegua, en la zona adyacente al cinturón

coriónico del embrión (Moor *et al.*, 1975). Cada copa endometrial consiste de una masa densamente plegada de células grandes binucleadas de tipo epitelioide, que están intercaladas entre las glándulas endometriales e irrigadas por vasos sanguíneos (Enders *et al.*, 1996). Estas estructuras alcanzan su máximo desarrollo alrededor del día 65 de la gestación, produciendo eCG que puede ser encontrada en la circulación hasta el día 130 de la gestación, llegando a la circulación materna por medio de la red de vasos linfáticos que se desarrolla debajo de cada copa (Allen, 1982).

A partir del día 60 de la gestación se inicia un proceso de degeneración en el cual algunas células de las copas endometriales comienzan a sufrir citolisis (Ginther, 1979). Después del día 70 ó 80, las copas endometriales en degeneración tienen una apariencia pálida y aplastada y su superficie cóncava se llena con secreciones pegajosas y con aspecto de miel (Allen, 1975). Para el día 80, las células de las copas presentan vacuolización y tienen un grado de degeneración pronunciado (Ginther, 1979). Todo este proceso de degeneración se debe a una vigorosa respuesta inmune citotóxica mediada por células inmunitarias maternas en contra de antígenos de histocompatibilidad tipo I extraños expresados en las células de la copa endometrial. Como resultado las copas se observan necróticas en la superficie del endometrio alrededor del día 100 – 120 (Allen, 1975).

Hacia el día 100 las copas comienzan a desprenderse y en algunos casos se convierten en bolsas corioalantoideas. Para el día 140 las células de las copas endometriales han desaparecido (Ginther, 1979). El genotipo fetal y el ambiente uterino ejercen marcadas influencias en el desarrollo de las copas endometriales y su secreción de eCG al determinar anchura, desarrollo general e invasividad del cinturón coriónico (Allen *et al.*, 1973).

4.5.2 ESTRUCTURA DE LA eCG

Todas las gonadotropinas son hormonas glicoproteínas heterodiméricas que se componen de una subunidad α y una subunidad β (Papkoff *et al.*, 1967).

La eCG es una glicoproteína de peso molecular aproximado de entre 64 (Christakos y Bahl, 1979) y 72 KDa (Gospodarowicz, 1967). Consiste de 2 cadenas polipeptídicas unidas en forma no covalente. La subunidad α es común a todas las hormonas glicoprotéicas del caballo (Pierce y Parson, 1981) y contiene 96 residuos de aminoácidos. La subunidad β difiere entre hormonas, y esta es la base para su diferente actividad biológica (Pierce y Parson, 1981). La subunidad β de la eCG consiste de 149 aminoácidos y es idéntica a la subunidad β de la LH equina (Sugino *et al.*, 1987), siendo ambas codificadas por el mismo gen, que se expresa en la hipófisis para sintetizar LH y en las copas endometriales para sintetizar eCG. La eCG es rica en prolina y hemi-cistina. También es notable su alto contenido de treonina y serina.

La eCG es la más glicosilada de las hormonas glicoprotéicas. La subunidad α tiene dos sitios de glicosilación. La subunidad β tiene un sitio N y cuatro sitios O de unión para glicosilación (Papkoff *et al.*, 1978b).

El contenido de carbohidratos de la eCG representa el 41.7% de la masa de la molécula, y las proporciones de ácido siálico (14.5%) y galactosa (11.6%) son mayores que las presentes en otras hormonas glicoprotéicas (Christakos y Bahl, 1979). La subunidad β tiene significativamente mayor contenido de ácido siálico (18%), galactosa (13.5%) y N-acetilglucosamina (9.9%) que la subunidad α , y a diferencia de esta última contiene N-acetilgalactosamina (Christakos y Bahl, 1979).

La eCG extraída directamente de las copas endometriales tiene mayor contenido de carbohidratos que la obtenida del suero. Esto se debe a que la glicosilación de las proteínas es un evento posterior a la transcripción, que se lleva a cabo en varias etapas durante el paso de la proteína a través del

aparato de Golgi (Manning *et al.*, 1987). De esta manera, la eCG presente dentro de las células de las copas endometriales es una mezcla de moléculas en diferente etapa del proceso, mientras que la forma circulante probablemente representa la forma madura de la glicoproteína.

La cantidad de carbohidratos presentes por unidad de eCG pueden variar entre preparaciones de eCG con mucha o poca actividad biológica (Aggarwal *et al.*, 1980). La cantidad de ácido siálico por miligramo de eCG varía no solamente entre yeguas sino también de acuerdo a la etapa de gestación en una misma yegua. (Manning *et al.*, 1987) El ácido siálico le confiere una vida media excepcionalmente larga comparada con otras hormonas glicoprotéicas (Murphy y Martinuk, 1991).

El bioensayo y los estudios de unión a receptores han demostrado que tanto la eCG como la eLH poseen actividad intrínseca significativa de FSH cuando se emplean en otras especies (Licht *et al.*, 1979 citado por Farmer y Papkoff, 1979).

Las estructuras primarias de la eLH y la eCG son idénticas, y la variación en el peso molecular de las dos formas se debe a las diferencias en el contenido de carbohidratos. La mayor diferencia existe en el contenido del ácido siálico, el cual es el doble en la eCG (Matteri *et al.*, 1986), lo que parece influenciar la capacidad de unión a los receptores de LH/eCG (Murphy y Martinuk, 1991).

4.5.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA eCG

La eCG tiene efectos parecidos a los de la LH equina (eLH) en los receptores y bioensayos *in vitro*. Sin embargo, a pesar de la completa homología de aminoácidos, la eCG tiene una menor actividad que la eLH. Por otra parte, en especies diferentes al equino, tanto la eCG como la eLH tienen actividad tanto de FSH como de LH. Esto es debido a que la eCG y la eLH se unen a los receptores de FSH de todas las especies mamíferas, excepto los équidos, produciendo en ellas efectos similares a los de la FSH (Murphy y

Martinuk, 1991). En cambio, los estudios de unión de receptores han mostrado que en el tejido ovárico de caballo y burro la eCG solamente se une a receptores de LH, con una afinidad cientos de veces menor que la de la LH. (Stewart y Allen, 1981). Cuando están aisladas, tanto la subunidad α como la β de la eCG tienen muy poca actividad biológica comparadas con la de la eCG completa (Papkoff, 1974).

Si se elimina el ácido siálico de la molécula de eCG se produce un aumento en la bioactividad de LH. En cambio, la actividad de FSH en receptores de otras especies se reduce cuando a la eCG se le elimina el 80 % del ácido siálico. (Manning *et al.*, 1987).

El ácido siálico tiene un rol en la regulación de la actividad biológica de las hormonas glicoprotéicas, permitiéndole persistir por más tiempo en la circulación después de su secreción o administración. El ácido siálico tiene efectos significativos en la distribución y desaparición de eCG (Manning *et al.*, 1987).

4.5.4 SECRECIÓN DE LA eCG

La primera aparición de eCG coincide con la migración de células coriónicas especializadas hacia el endometrio. La eCG se ha aislado de suero de yeguas y burras gestantes, de las copas endometriales y de células del trofoblasto cultivadas *in vitro* (Aggarwal *et al.*, 1980). El patrón de aparición de eCG sérica se ha correlacionado con los cambios histológicos en las copas endometriales (Allen, 1975).

La examinación ultraestructural del componente coriónico de las copas endometriales revela que no existen gránulos de secreción como los que se encuentran en las células hipofisarias secretoras de gonadotropinas (Hamilton *et al.*, 1973). Por lo tanto, es probable que las células coriónicas secreten eCG en forma constitutiva. Los niveles séricos de eCG en la yegua no experimentan cambios episódicos, lo que sugiere que no se secreta en

forma pulsátil sino en forma constante. Además, la inyección de GnRH no tiene efectos sobre las concentraciones de eCG (Thompson *et al.*, 1982). La retroalimentación por esteroides tampoco parece afectar la secreción de eCG (Nett y Pickett, 1979).

La secreción de eCG persiste después de la pérdida o eliminación del feto, sugiriendo que las células de las copas endometriales continúan funcionando en ausencia de un feto viable (Squires *et al.*, 1980; Jeffcott *et al.*, 1987).

Hacia la segunda mitad de la gestación las copas endometriales son destruidas debido a que se produce una reacción inmunológica mediada por células inmunes maternas en contra de las células de las copas endometriales, lo que resulta en la interrupción de la síntesis y secreción de eCG (Allen, 1982; Antczak *et al.*, 1989). Las copas endometriales expresan antígenos paternos para el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC; Antczak *et al.*, 1989), y son estos antígenos los que son atacados por las células inmunes maternas.

La respuesta inmune de la madre en contra de las copas endometriales se inicia muy pronto después de la formación de las copas endometriales, por lo que comienza a ser detectable entre el día 45 y 70 de la gestación (Antczak *et al.*, 1984).

Las concentraciones circulantes de eCG son considerablemente menores en burros que en caballos (Allen, 1982). En híbridos, la cantidad y duración de la secreción de eCG son influenciadas por el padre, indicando que hay un efecto del genoma paterno sobre la secreción de esta hormona. En parte, la variación en las concentraciones de eCG entre especies e híbridos puede ser atribuida al tamaño de las copas endometriales. En la burra son pequeñas y de tamaño limitado. En cambio, cuando se gesta un burdégano las copas endometriales son grandes y anchas y producen grandes cantidades de eCG. Por otra parte, cuando se gesta un embrión mula las copas endometriales son pequeñas y con poca secreción de eCG. En este último caso se produce una muy rápida invasión leucocitaria de las copas

endometriales, lo que resulta en su destrucción temprana y la consecuente interrupción de la síntesis de eCG. (Allen, 1982).

Existen diferencias importantes entre yeguas con respecto a la cantidad de eCG circulante. Algunas yeguas producen en forma repetida cantidades muy bajas de eCG (Boeta y Zarco, 2005). Se han hecho suposiciones de que la influencia de la yegua en la cantidad de eCG producida se relaciona con la conformación del útero, que puede resultar en diferencias en la superficie endometrial disponible para el establecimiento de las copas endometriales (Allen, 1982).

4.5.5 PERSISTENCIA DE LA eCG EN LA CIRCULACIÓN

El grado de glicosilación de la eCG da como resultado la persistencia en la sangre de la yegua y de otras especies por periodos muy largos en comparación con otras hormonas glicoprotéicas. La prolongada vida media se ha atribuido al ácido siálico presente en la eCG.

En el primer estudio sobre ritmo de eliminación de la eCG se encontró una vida media de 6 días en equinos castrados, y de 24 a 26 h en la circulación de yeguas. La eCG atraviesa en forma muy ineficiente la barrera renal, por lo que solamente el 1 % es eliminada por la orina (Cole *et al.*, 1967).

4.5.6 FUNCIÓN DE LA eCG EN ÉQUIDOS

Tradicionalmente se ha considerado que la función de la eCG es estimular la formación de cuerpos lúteos accesorios durante la gestación de la yegua, así como estimular la producción de progesterona tanto por el cuerpo lúteo primario como por los secundarios. Sin embargo, existen evidencias de que la gestación puede culminar en forma exitosa en ausencia de concentraciones importantes de eCG (Boeta y Zarco, 2005), y de que los cuerpos lúteos accesorios no son necesarios para una gestación exitosa en la yegua (Boeta, 2008). Por ello, a pesar de todo lo que se sabe acerca de la

estructura y actividad biológica de la eCG, actualmente no es posible asegurar cual es su función durante la gestación de la yegua.

Como se mencionó en el párrafo anterior, se ha considerado que la función de la eCG es causar la formación o mantenimiento de estructuras lúteas que comienzan a formarse en la mayoría de las yeguas a partir del día 35 a 40 de la gestación (Cole *et al.*, 1946). Estas estructuras son conocidas como cuerpos lúteos secundarios y son derivadas de ovulaciones durante la gestación o bien de la luteinización de folículos ováricos que se desarrollan entre los días 17 y 50 de la gestación sin llegar a ovular (Ginther *et al.*, 1979).

Tanto el cuerpo lúteo primario como los secundarios persisten hasta el quinto mes de la gestación (Squires *et al.*, 1974), secretando progesterona en forma continua durante este periodo (Squires *et al.*, 1975, 1979). En la mayoría de las yeguas se produce un incremento en las concentraciones de progesterona en forma coincidente con la primera elevación de eCG alrededor del día 35 de la gestación, aún antes de la formación de cuerpos lúteos accesorios, lo que indica que la eCG estimula la esteroidogénesis en el cuerpo lúteo (Squires *et al.*, 1979; Urías *et al.*, 2008).

Las gestaciones de yeguas servidas con burro (embrión mula) se caracterizan por tener concentraciones muy bajas de eCG (Stewart *et al.*, 1981), lo que ocasiona que las concentraciones de progesterona en este tipo de gestación sean significativamente menores que los de yeguas gestantes con caballo durante el tercer y cuarto mes de la gestación (Boeta y Zarco, 2005; Boeta, 2008). A pesar de ello, muchas yeguas gestantes con embrión mula llevan a término en forma exitosa la gestación, lo que demuestra que la eCG no es indispensable durante la gestación equina.

Por lo anterior, se ha postulado que tanto la eCG como los cuerpos lúteos secundarios constituyen un sistema redundante para asegurar el mantenimiento de la gestación en casos especiales hasta que la producción de progesterona placentaria sea suficiente para continuar con la gestación (Boeta y Zarco, 2005; Boeta, 2008). Tal vez la eCG sea esencial para la

gestación en algunas yeguas (Murphy y Martinuk, 1991), o podría serlo solamente cuando una yegua se enfrente a situaciones especiales, como lo sería la liberación endógena de PGF2 α (Boeta, 2008). En estos casos la eCG podría servir como un sistema extra para asegurar que haya suficiente secreción de progesterona por el cuerpo lúteo primario y los cuerpos lúteos secundarios para mantener la gestación hasta que la placenta asuma su rol como el principal órgano esteroidogénico de la gestación.

4.5.7 FUNCIÓN LUTEOTRÓPICA DE LA eCG

Los niveles plasmáticos de progesterona se incrementan rápidamente durante los primeros 6 a 10 días después de la ovulación, manteniéndose constantes o declinando lentamente entre a partir del día 10 (Squires y Ginther, 1975).

En la yegua vacía el CL sufre luteolisis a partir del día 16 post-ovulación. En cambio, en la yegua gestante la vida del cuerpo lúteo se prolonga por una regulación a la baja de los receptores endometriales de oxitocina, lo que evita el establecimiento de un patrón luteolítico de secreción de prostaglandina F2 α . A pesar de ello, después del día 16 la función del cuerpo lúteo decae y las concentraciones de progesterona declinan gradualmente (Allen, 2001)

Posteriormente, y coincidiendo con el inicio de la secreción de eCG (día 35 a 38 de la gestación) se produce un incremento significativo en las concentraciones de progesterona como resultado de la estimulación luteotrópica del cuerpo lúteo primario (Squires y Ginther, 1975; Urías, 2008). A partir del día 40 se pueden formar cuerpos lúteos accesorios que producen cantidades adicionales de progesterona. Al parecer estos cuerpos lúteos accesorios se forman como resultado de la acción gonadotrópica concertada de la FSH hipofisiaria y la eCG (Allen, 2001). Como resultado tanto de la estimulación del cuerpo lúteo primario como de la formación de los cuerpos lúteos las concentraciones de progesterona se elevan en forma significativa entre el día 35 y el día 45 de la gestación (Squires *et al*, 1974; Holtan *et al.*, 1975; Kooistra y Ginther, 1976; Bergfelt *et al*, 1989).

Para la formación de los cuerpos lúteos accesorios es necesario que antes se desarrollen folículos preovulatorios, lo cual ocurre en forma cíclica desde el inicio de la gestación como resultado de la acción de la FSH hipofisiaria, cuya secreción no es inhibida por la progesterona (Squires y Ginther, 1975; Urwin y Allen, 1982). Sin embargo, la LH hipofisiaria si está sujeta a una estricta retroalimentación negativa por parte de la progesterona, por lo que ninguno de los folículos formados durante las primeras 4 o 5 semanas de la gestación llega a ovular (Urwin y Allen, 1982). En cambio, a partir del día 35 de la gestación existen concentraciones elevadas de eCG, la cual debido a su acción de LH es capaz de provocar la ovulación del siguiente folículo que se desarrolle bajo la influencia de la FSH.

Aunque en algunas investigaciones se ha informado que las células lúteas equinas recolectadas durante el diestro no incrementan su producción de progesterona en respuesta a tratamientos *in vitro* con eCG (Neely *et al.*, 1990), la adición de eCG a cultivos de cortes de CL primarios y secundarios del día 100 de gestación sí resultó en un aumento en la producción de progesterona (Squires *et al.*, 1979), lo que demuestra que la eCG tiene la capacidad de estimular la producción de progesterona en los CL primarios y secundarios de la gestación.

Después del día 150 de la gestación, y debido a la desaparición de la eCG de la circulación, los cuerpos lúteos primarios y secundarios sufren regresión, para dejar los ovarios pequeños y completamente inactivos durante el resto de la gestación.

4.6 GESTACIONES INTRAESPECIE E INTERESPECIE

Los équidos poseen la habilidad inusual de poder reproducirse con miembros de otras especies de su género y producir descendencia viable, aunque generalmente infértil. La mula es el híbrido de yegua x burro, y ha sido producida y utilizada durante miles de años por el hombre. La expresión clara de los dos fenotipos de los padres en la mula ha contribuido al

entendimiento de la herencia genética a través de los siglos (Allen y Short, 1997)

La mula (yegua X burro; $2n= 63$) y su cruce recíproca, el burdégano (burra X caballo; $2n = 63$), son los híbridos equinos más comunes (Allen y Short, 1997). El genotipo fetal tiene una marcada influencia en el desarrollo placentario de los équidos, especialmente en lo que se refiere a la anchura y desarrollo general del cinturón coriónico (Allen y Short, 1997). El cinturón coriónico del embrión mula es apreciablemente más estrecho que el cinturón del embrión equino en el mismo estado de gestación, aunque histológicamente es similar, con una superficie aplanada cubierta por una aparente capa continua de células trofoblásticas hiperplásicas (Enders *et al*, 1996). Este cinturón coriónico más pequeño da lugar, después de la invasión del endometrio materno, a copas endometriales mucho más pequeñas y menos productoras de eCG, debido a lo cual los niveles séricos de eCG son considerablemente menores en la gestación mular que en la gestación con embrión equino.

Además, en la yegua gestante con feto mula la eCG deja de secretarse en etapas tempranas de la gestación debido a una excesiva respuesta inmune materna en contra de las células invasoras del trofoblasto, que sufren necrosis prematura (Allen, 1975).

Igualmente inusual y de considerable interés científico, ha sido el descubrimiento de que tanto la yegua como la burra y la mula son capaces de aceptar, gestar, llevar a término, parir y criar exitosamente verdaderos productos xenogénicos cuando a una de estas especie se le transfiere un embrión de la otra especie (Allen, 1982b).

El desarrollo del embrión extraespecie en un ambiente uterino xenogénico está acompañado por marcadas diferencias en la tasa de desarrollo, tamaño final, vida media y actividad endocrina de las copas endometriales equinas.

En un experimento se utilizaron embriones genéticamente idénticos producidos mediante la bisección de embriones mula en el sexto día después de la ovulación. Los embriones resultantes (Skidmore *et al.*, 1989) fueron transferidos a receptoras yeguas y a receptoras burras. Los resultados fueron el desarrollo de copas endometriales anchas que secretaron grandes cantidades de eCG hacia la sangre de la burra que sirvió como receptora, comparada con bajas concentraciones séricas de eCG y copas endometriales pequeñas, estrechas, prematuras y en cierto grado necróticas en las yeguas receptoras (Allen *et al.*, 1993). Estos resultados demuestran que los embriones híbridos no tienen un defecto intrínseco en su capacidad de formar copas endometriales y producir eCG, sino que sufren un ataque inusualmente fuerte por el sistema inmune de la yegua, lo que no ocurre si la madre receptora es una burra.

El útero de la yegua parece afectar negativamente el desarrollo de las copas endometriales de cualquier embrión que contenga un componente de burro (embrión burro o embrión mula), mientras que el útero de la burra estimula el desarrollo de las copas endometriales de cualquier embrión que tenga un componente de caballo. (Allen *et al.*, 1993). Esto sugiere que el útero de la burra es más permisivo que el útero de la yegua en términos de aceptar gestaciones inter e intraespecies.

Se ha postulado un mecanismo para explicar la influencia dramática del útero de burra en el desarrollo del cinturón coriónico de embriones mula. Se podría tratar de un factor de crecimiento que puede jugar un papel importante en el desarrollo del cinturón coriónico y que sería secretado por el endometrio bajo control genético paterno (Allen *et al.*, 1993b).

Otro fenómeno a considerar es que en la gestación de caballo y de burdégano se desarrolla un cinturón coriónico ancho, grueso y activo. Ambos tipos de gestación tienen como padre a un caballo semental y esto da lugar a copas endometriales grandes y activas en ambos tipos de gestación, secretando concentraciones altas de eCG en el torrente sanguíneo de la madre, con persistencia de la actividad gonadotrópica hasta los 120 – 140

días de gestación (Allen, 1975; 1993). El genotipo paterno en cierta manera gobierna el desarrollo del cinturón coriónico. El mecanismo responsable de estas grandes diferencias permanece desconocido, aunque es tentativo suponer que el fenómeno de impronta génica puede jugar un papel específico (Allen y Short, 1997).

Cuando se emplean en otras especies, la proporción FSH:LH de la eCG producida por un embrión de caballo es cercano a 1, en tanto que el de la eCG producida por embrión de burro es de alrededor de 0.2. Los embriones de mula y burdégano producen eCG en una proporción FSH:LH de 0.5 a 0.7, que es aproximadamente la mitad entre los de caballo y burro (Stewart *et al.*, 1977), lo que sugeriría que el gen de la eCG no está improntado, aunque sí podrían estarlo algunos de los genes que regulan el desarrollo de las copas endometriales o de los que intervienen en el mecanismo de rechazo inmunológico de las mismas.

4.7 RESISTENCIA A LA PGF2 α EN LA YEGUA GESTANTE

Al igual que ocurre en otras especies (McCracken, 1984; Zarco *et al.*, 1988), la secreción pulsátil de PGF2 α que se observa normalmente en las yeguas no gestantes está ausente durante la gestación temprana (Kindahl *et al.*, 1982). Las bajas concentraciones intrauterinas de PGF2 α en yeguas gestantes y la baja producción in vitro de PGF2 α del tejido endometrial mantenido en presencia de membranas embrionarias reflejan la acción inhibitoria ejercida por la presencia del embrión en la síntesis y liberación de PGF2 α (Berglund *et al.*, 1982).

Sin embargo, en la mayoría de las especies es posible destruir los cuerpos lúteos de las hembras gestantes mediante la administración exógena de PGF2 α , lo que generalmente resulta en la inducción de aborto. Estas propiedades abortivas de la PGF2 α se demostraron inicialmente en especies

de laboratorio (Douglas *et al.*, 1974) y posteriormente en diversas especies domésticas.

En la yegua la gestación es dependiente durante los primeros 40 días de la progesterona secretada por el cuerpo luteo materno, y la administración de una dosis simple de PGF2 α o algún análogo es suficiente para causar la regresión completa del cuerpo lúteo y terminar la gestación (Squires *et al.*, 1993). Sin embargo, después del segundo mes de gestación se necesita la administración múltiple de prostaglandina, a intervalos de 12 o 24 horas, para logra la inducción del aborto en las yeguas (Ginther, 1992). Esta resistencia parece deberse a la presencia de eCG, cuyos efectos luteotrópicos al parecer protegen a los cuerpos lúteos de los efectos luteolíticos de la PGF2 α (Allen, 2001).

Las yeguas gestantes con embrión mula tienen una elevada incidencia de abortos, los cuales en muchos casos son precedidos por una repentina caída en las concentraciones de progesterona, sugestiva de la ocurrencia de un proceso de luteolisis activa por liberación de PGF2 α (Boeta y Zarco, 2005; Boeta, 2008). De acuerdo a ésta hipótesis, a diferencia de las yeguas gestantes con embrión equino, las gestantes con embrión mula serían susceptibles, debido a su ausencia de eCG, a la liberación endógena de PGF2 α que acompaña a diversas patologías (Boeta, 2008). Por esta razón en el presente trabajo se pretende comparar los efectos de la PGF2 α sobre la función lútea y viabilidad fetal de yeguas gestantes con embrión equino y yeguas gestantes con embrión mula.

4.8 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD FETAL

La medición de las concentraciones de progesterona materna es un método poco confiable para detectar la muerte embrionaria o fetal. Esto es debido a que después de la pérdida del embrión equino generalmente se mantienen altas las concentraciones de progesterona durante varias semanas o meses (Allen, 1978), lo que aparentemente se debe al soporte gonadotrópico aportado por la eCG producida por las copas endometriales,

las cuales pueden continuar funcionando durante varias semanas después de la muerte del feto (Allen y Moor, 1972).

Una hormona que aporta mejor información sobre la viabilidad fetal es el sulfato de estrona. Las concentraciones plasmáticas y urinarias de esta hormona en yeguas gestantes se incrementan alrededor del día 37 de gestación (Kindahl *et al.*, 1982; Evans *et al.*, 1984). A partir de este momento las concentraciones de sulfato de estrona se elevan en forma continua, alcanzando niveles plasmáticos máximos de alrededor de 700 ng/ml en la semana 22. (Hoffmann, 1996). El primer incremento de estrógenos conjugados que comienza después del día 36 de gestación es de origen ovárico (Daels *et al.*, 1991), pero el segundo incremento, que comienza entre los días 50 y 60, es resultado de la producción de estrógenos libres y conjugados por la placenta (Kindahl *et al.*, 1982), y depende de la presencia de un feto viable y una placenta normal. La muerte del producto es acompañada por un descenso inmediato y dramático en las concentraciones de sulfato de estrona en la madre (Boeta, 2008). Esto se debe a que la producción de estrógenos placentarios en la yegua involucra tanto al feto como a las gónadas fetales (Pashen y Allen, 1979).

Por esta razón la medición de las concentraciones maternas de sulfato de estrona se ha utilizado para monitorear la viabilidad embrionaria después del día 40 de gestación (Jeffcott *et al.*, 1987).

Otra forma de evaluar la viabilidad fetal consiste en el monitoreo ultrasonográfico para confirmar el latido cardíaco y/o movimientos del embrión o feto (Boeta y Zarco, 2005; Boeta, 2008). La utilización simultánea de monitoreo ultrasonográfico, y determinación de las concentraciones de sulfato de estrona y determinación de las concentraciones de progesterona permite no solamente detectar la muerte del producto sino contar con elementos para postular la posible causa de dicha muerte.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el rancho “San Francisco” perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México, el cual se localiza en Chalco, Estado de México, en la latitud 19° 09´ 20” N y longitud 90° 58´ 17” oeste. La altitud media del municipio es de 2,550 metros sobre el nivel del mar.

Se utilizaron 12 yeguas gestantes con burro y 9 yeguas gestantes con caballo. Todas eran yeguas entre 3 y 10 años de edad, clínicamente sanas. La condición corporal de las yeguas se encontraba en general entre 2.5 y 3.5 (escala 0 a 5) (Martin-Rosset, 1993). Las yeguas se mantuvieron estabuladas en corrales con agua a libre acceso y templetas para sombra, y fueron alimentadas con heno de avena, alfalfa achicalada y concentrado comercial.

Para dejar gestantes a las yeguas se utilizaron como sementales un burro Kentucky y un caballo criollo. Se realizaron exámenes ginecológicos completos antes de inseminar a cada yegua para verificar la ausencia de condiciones patológicas clínicamente detectables. Posteriormente las yeguas fueron sincronizadas con un progestágeno por vía oral (Altrenogest 0.044mg/kg). Una vez en estro se revisaron ultrasonográficamente para programar la inseminación artificial o monta directa en el momento más cercano a la ovulación, utilizando en caso de ser necesario gonadotropina coriónica humana (1500-3000 UI de hCG) para programar la ovulación (Ginther 1986; Meyers, 1993).

Para la inseminación artificial se colectó semen del burro Kentucky y del semental criollo por medio de vagina artificial modelo Missouri, y se hizo la dilución del semen 2:1 en leche descremada ultrapasteurizada, conservándose en refrigeración a 5°C en un equitainer (Hamilton Thorn) hasta la inseminación artificial (Boeta y Zarco, 2000).

Se realizó el diagnóstico de gestación a partir de los 16 días post-inseminación con un ultrasonido Aloka de tiempo real.

Al llegar al día 60 de la gestación las yeguas se asignaban al azar (dentro de cada tipo de gestación) a un tratamiento con PGF2 α sintética (cloprostenol) o con solución salina fisiológica (SSF), quedando los grupos de la siguiente manera:

- Grupo Equino-PGF2 α , conformado por 4 yeguas gestantes con caballo.
- Grupo Burro-PGF2 α , conformado por 6 yeguas gestantes con burro.
- Grupo Equino-SSF, conformado por 5 yeguas gestantes con caballo.
- Grupo Burro-SSF, conformado por 6 yeguas gestantes con burro.

A los grupos Equino-PGF2 α y Burro-PGF2 α se les administró una inyección intramuscular de 0.25 mg de PGF2 α sintética (Cloprostenol) entre el día 65 y el día 75 de la gestación. El tratamiento se repitió a las 48 h, y a partir de este momento se repitió la dosis cada 24 h hasta que se registrara la expulsión del producto. A los grupos Equino-SSF y Burro-SSF se les administró una inyección intramuscular de solución salina fisiológica (SSF, 1ml) entre el día 65 y 75 de la gestación, repitiéndose la dosis a las 48 h de la primera aplicación y a partir de este momento se repitió la dosis cada 24 h durante tres días.

Se determinaron las concentraciones de eCG inmediatamente antes de administrar la primera inyección de cloprostenol o de SSF (tiempo 0), así como a las 24, 48 y 72 horas posteriores. Las concentraciones de progesterona y sulfato de estrona se determinaron en el tiempo 0 y a las 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas después de la primera inyección de cloprostenol o SSF. Para ello se obtuvieron muestras sanguíneas de cada yegua mediante punción de la vena yugular, utilizando tubos al vacío con gel activador del suero. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1500 x G con una centrífuga de mesa. Este procedimiento se realizó durante 15 minutos dentro de la primera hora posterior a su obtención para separar el plasma (Boeta, 2008), que se mantuvo en congelación a -20

°C, hasta el momento de realizar las determinaciones hormonales. Las determinaciones de progesterona se realizaron por medio de un radioinmunoanálisis en fase sólida, empleando el kit Coat-A-Count® Progesterona (Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA., U.S.A; Pulido *et al.*, 1991). Con una sensibilidad de 0.01 ng/ml y un coeficiente de variación intraensayo de 10.59%. Las concentraciones totales de eCG se determinaron mediante enzimo inmunoensayo (Boeta, 2008), basado en el principio de sándwich (PMSG ELISA EIA-1298, Paramedical ^{SRL}, Italia) con una sensibilidad del ensayo de 3 UI/ml, coeficiente de variación intraensayo de 7.5%. Las concentraciones de sulfato de estrona se determinaron mediante un radioinmunoanálisis de fase sólida (Kindahl, 1982). Con una sensibilidad de 0.02 ng/ml y un coeficiente de variación intraensayo de 3.34%.

Para evaluar el momento en que ocurrió la muerte del producto y la expulsión del mismo, cada yegua fue explorada ultrasonográficamente inmediatamente antes de la aplicación del primer tratamiento, y posteriormente cada 12 horas hasta verificarse la muerte fetal, evidenciada por ausencia de latido cardíaco y de movimiento fetal, y posteriormente la ausencia del producto en el útero materno (evidencia de expulsión), utilizando un aparato de tiempo real con transductor de 3.5 Mhz.

Las concentraciones de cada una de las hormonas en cada uno de los periodos de muestreo se compararon entre grupos mediante análisis de varianza para mediciones repetidas, utilizando como factores principales el tipo de gestación (servicio con caballo o servicio con burro) y el tratamiento (PGF2 α o SSF). Los efectos del tipo de gestación (servicio con equino o con burro) sobre los intervalos promedio entre los tratamientos con PGF2 α y la reducción en las concentraciones de progesterona a menos de 1 ng/ml, la muerte del producto, y la expulsión del mismo se compararon mediante pruebas de “t” de Student.

6. RESULTADOS

En la Figura 1 se observa que, inmediatamente antes de recibir la primera inyección de PGF2 α o SSF (hora 0) las concentraciones de eCG eran significativamente mayores ($p < 0.01$) en las yeguas gestantes con equino que en las yeguas gestantes con burro. Dentro de cada tipo de gestación no existieron diferencias en las concentraciones de eCG de las yeguas programadas para recibir PGF2 α o SSF. Los tratamientos con PGF2 α no afectaron la subsecuente producción de eCG, ya que en todos los muestreos las concentraciones de esta hormona se mantuvieron en niveles similares a los registrados en el mismo grupo en el tiempo 0 (entre 90 y 100 U.I. para las yeguas gestantes con caballo y menores a 10 U.I. para las yeguas gestantes con burro), y en ningún caso se registraron diferencias con respecto al grupo tratado con SSF del mismo tipo de gestación.

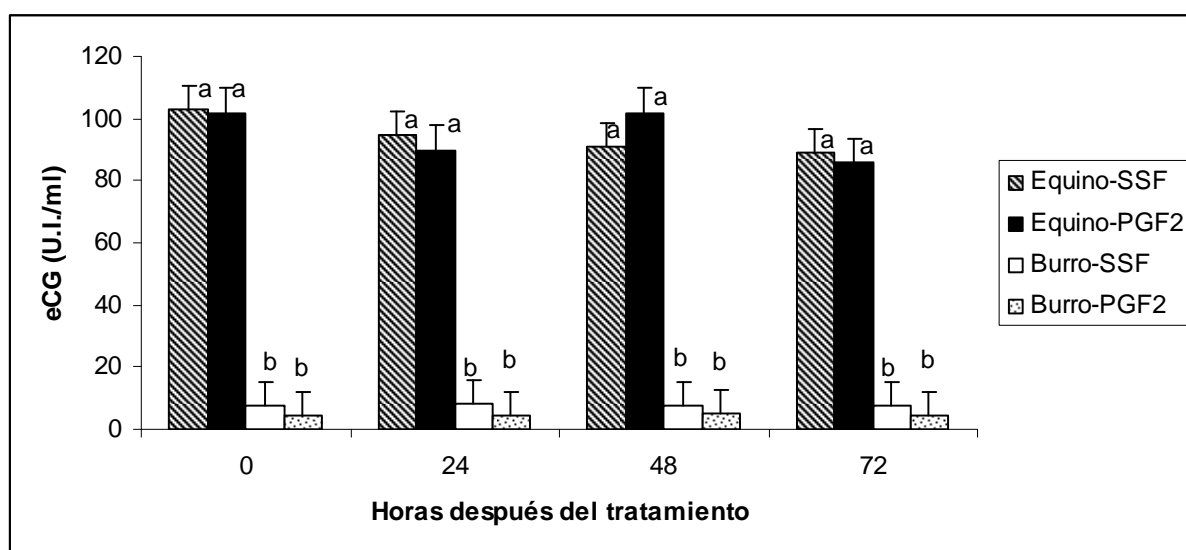


Figura 1. Concentraciones de eCG inmediatamente antes (hora 0) y a diversos intervalos después del primer tratamiento con 0.25 mg de PGF2 α sintética (cloprostenol) o con 1 ml de SSF en yeguas gestantes con caballo y yeguas gestantes con burro. ^{a,b} Literales diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.01$).

En la Figura 2 se observa que las concentraciones promedio de progesterona de las yeguas testigo (tratadas con SSF) gestantes con caballo siempre fueron significativamente mayores que las de las yeguas testigo gestantes con burro. Dentro de cada tipo de gestación no se produjeron variaciones significativas a lo largo del tiempo durante el periodo de muestreo.

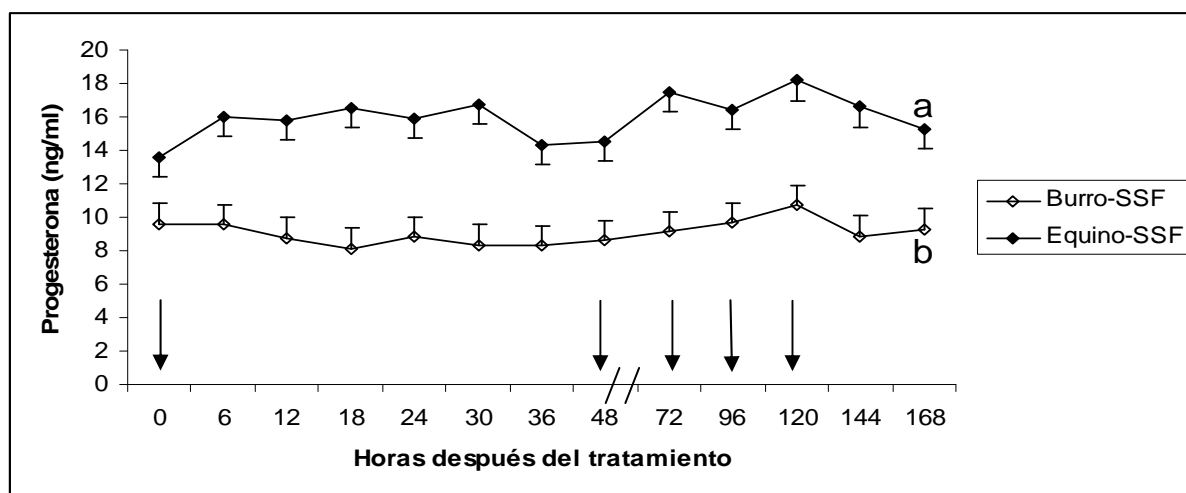


Figura 2. Concentraciones de progesterona en yeguas gestantes con burro y yeguas gestantes con caballo en diferentes momentos en relación a la administración de 1 ml de SSF (hora 0). Nótese el cambio de escala de tiempo a partir de las 48 h. ^{a,b} Literales diferentes indican que las dos curvas son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). Las flechas indican el momento de administración de la SSF

En la Figura 3 se observa que las concentraciones de progesterona de las yeguas gestantes con caballo comenzaron a disminuir inmediatamente después de la primera administración de $\text{PGF2}\alpha$, siendo significativamente menores que las de las yeguas tratadas con SSF a partir de las 18 horas post-tratamiento. Entre las 30 y las 48 horas las concentraciones de progesterona de las yeguas tratadas con $\text{PGF2}\alpha$ se estabilizaron en niveles cercanos a los 7 ng/ml, para volver a caer después de la segunda inyección de $\text{PGF2}\alpha$ y dejar de ser significativamente diferentes a 0 ng/ml a partir de las 96 horas post-tratamiento

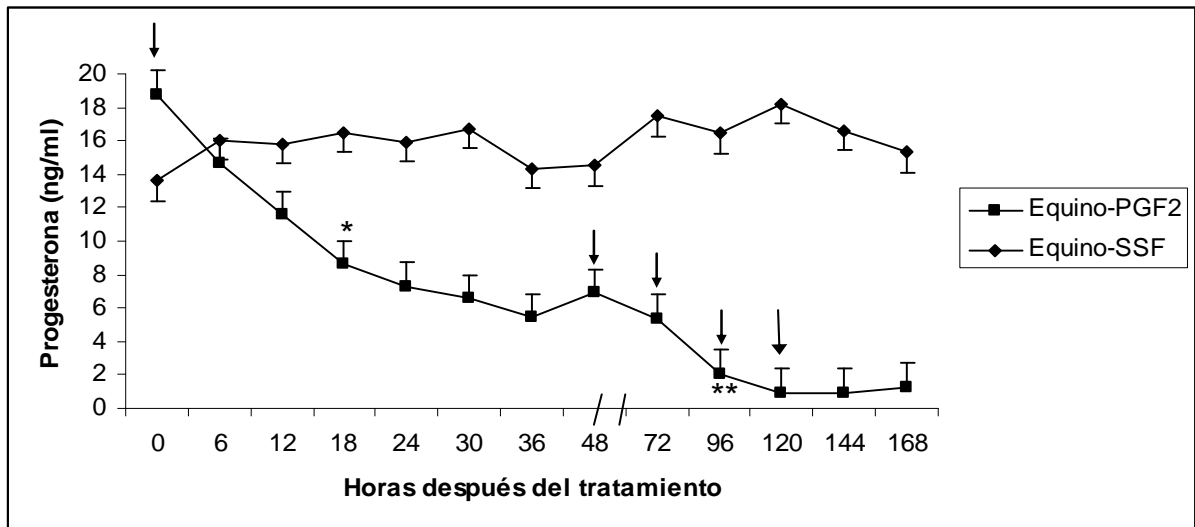


Figura 3. Concentraciones de progesterona en yeguas gestantes con caballo en diferentes momentos en relación a la administración de 0.25 mg de PGF2 α sintética o 1 ml de SSF (hora 0). Nótese el cambio de escala de tiempo a partir de las 48 h. El momento a partir del cual las concentraciones de progesterona fueron significativamente ($p < 0.05$) menores en el grupo tratado con Equino-PGF2 α que en el grupo Equino-SSF se indica con *. El momento en el que las concentraciones de progesterona dejaron de ser significativamente diferentes a 0 ng/ml se indica con **. Las flechas indican el momento de administración de PGF2 α (Cloprostenol)

En la Figura 4 se observa que las concentraciones de progesterona de las yeguas gestantes con burro comenzaron a disminuir inmediatamente después de la primera administración de PGF2 α , siendo significativamente menores que las de las yeguas tratadas con SSF a partir de las 18 horas post-tratamiento. A partir de las 24 horas las concentraciones de progesterona del grupo burro-PGF2 α dejaron de ser significativamente diferentes a 0 ng/ml.

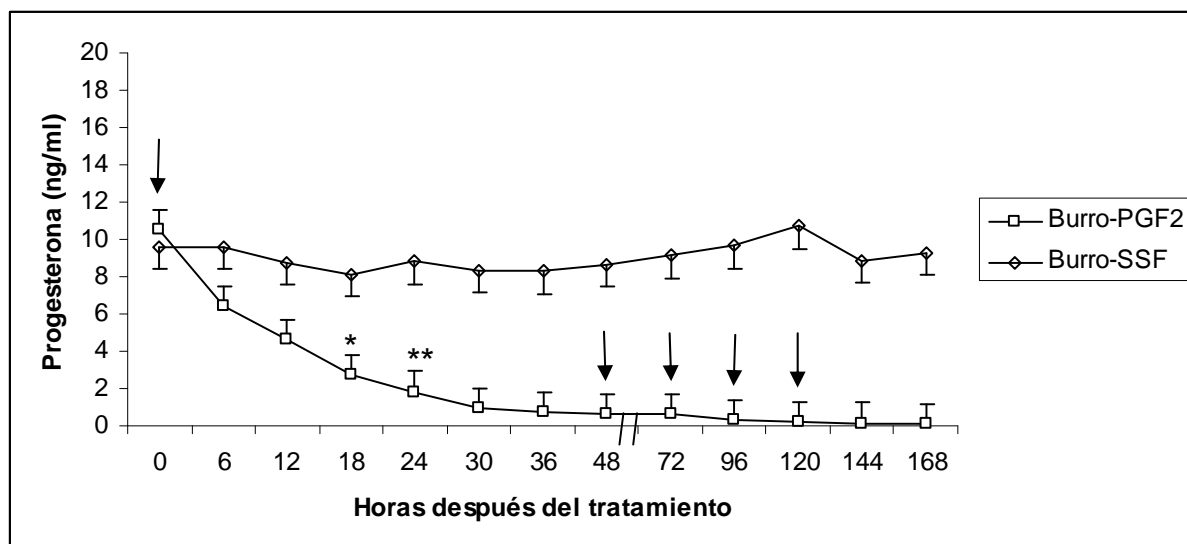


Figura 4. Concentraciones de progesterona en yeguas gestantes con burro en diferentes momentos en relación a la administración de 0.25 mg de PGF2 α sintética o 1 ml de SSF (hora 0). Nótese el cambio de escala de tiempo a partir de las 48 h. El momento a partir del cual las concentraciones de progesterona fueron significativamente ($p < 0.05$) menores en el grupo tratado con Equino-PGF2 α que en el grupo Equino-SSF se indica con *. El momento en el que las concentraciones de progesterona dejaron de ser significativamente diferentes a 0 ng/ml se indica con **. Las flechas indican el momento de administración de PGF2 α (Cloprostenol) y/o SSF.

Al comparar las concentraciones de progesterona de los dos grupos tratados con PGF2 α se advierte que durante las primeras 36 horas los dos grupos siguieron un ritmo de descenso similar aunque partiendo de concentraciones iniciales de progesterona diferentes para cada grupo (Figura 5). En el grupo de yeguas gestantes con caballo las concentraciones de progesterona al parecer comenzaban a recuperarse a las 48 horas, para volver a caer al aplicarse la segunda inyección de PGF2 α . En el grupo de yeguas gestantes con burro las concentraciones de progesterona cayeron a niveles estadísticamente indistinguibles de 0 ng/ml 24 horas después de la primera administración de PGF2 α , cuando solamente se había aplicado una inyección de la hormona. En cambio, en el grupo de yeguas gestantes con caballo se requirieron 96 horas para que las concentraciones llegaran a niveles similares a 0 ng/ml.

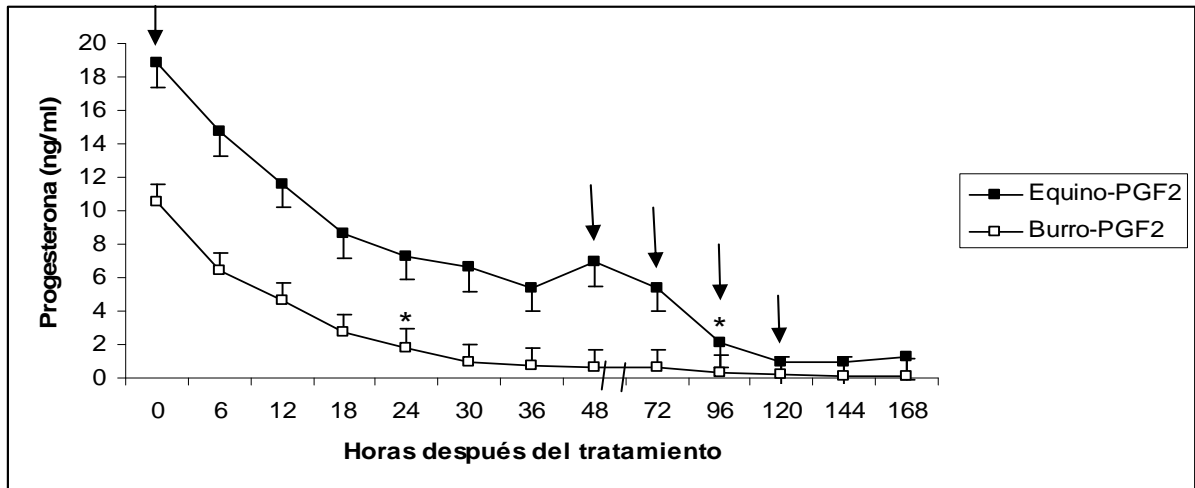


Figura 5. Concentraciones de progesterona en yeguas gestantes con burro y yeguas gestantes con caballo en diferentes momentos en relación a la administración de 0.25 mg de PGF2 α sintética. Nótese el cambio de escala de tiempo a partir de las 48 h. El momento a partir del cual las concentraciones de progesterona dejaron de ser significativamente diferentes a 0 ng/ml en cada grupo se indica con **. Las flechas indican el momento de administración de PGF2 α (Cloprostenol)

En la Figura 6 se muestran los intervalos promedio que transcurrieron desde que se administró la primera inyección de PGF2 α hasta que las concentraciones de progesterona cayeron a menos de 1 ng/ml, desde la primera administración de PGF2 α hasta que se registró ultrasonográficamente la muerte fetal, y desde la primera inyección de PGF2 α hasta que se registró la expulsión del producto. Aunque en todos los casos los intervalos fueron numéricamente más largos para las yeguas gestantes con caballo que para las gestantes con burro, las diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$). En general la muerte fetal se produjo entre 10 y 20 horas después de la caída de progesterona a menos de 1 ng/ml, produciéndose la expulsión del producto dentro de las 24 horas siguientes a su muerte.

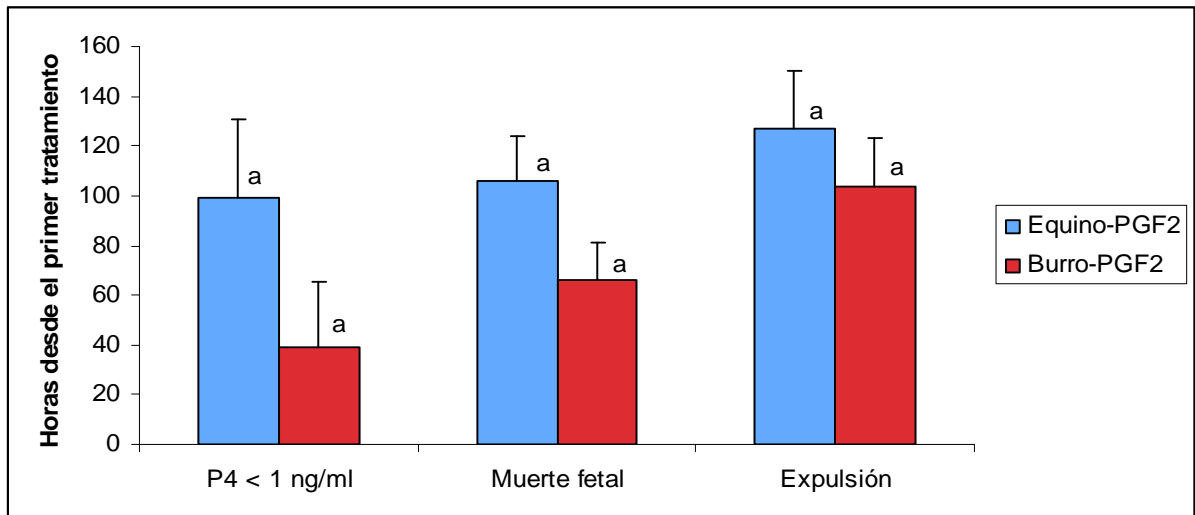


Figura 6. Intervalos entre la primera inyección de PGF2 α y diversos eventos en yeguas gestantes con caballo y yeguas gestantes con burro tratadas con PGF2 α .

En la Figura 7 se muestran las concentraciones de sulfato de estrona en cada uno de los grupos. Los resultados indican que al iniciarse el experimento la unidad-feto placentaria aún no comenzaba a producir cantidades apreciables de sulfato de estrona, lo cual solamente comenzó a ocurrir en los grupos testigo durante los últimos dos muestreos. En cambio, en los grupos tratados con PGF2 α no se produjo este incremento final, registrándose en cambio una caída a niveles basales

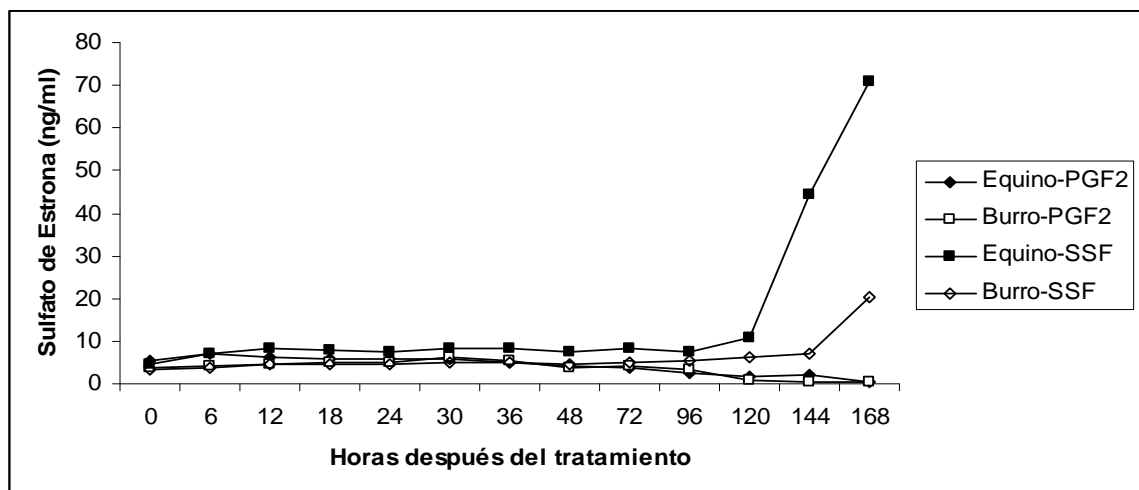


Figura 7. Concentraciones de sulfato de estrona en diversos momentos después de la administración de PGF2 α o SSF a yeguas gestantes con caballo o yeguas gestantes con burro.

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se confirmaron los informes de Boeta y Zarco (2005) y Boeta (2008) en el sentido de que entre el día 65 y 75 de la gestación las concentraciones de eCG (Figura 1) y progesterona (Figura 2) son significativamente más elevadas en yeguas servidas con caballo (feto equino) que en yeguas servidas con burro (feto mula), y que para ésta etapa de la gestación mular las concentraciones de eCG han descendido a niveles inferiores a los 10 (UI/ml), mientras que en las yeguas gestantes con caballo se mantienen mucho más elevadas (figura 1).

Los bajos niveles de eCG en las yeguas servidas con burro se deben al rechazo prematuro de las copas endometriales montado por el sistema inmune de la yegua en contra de los antígenos de histocompatibilidad paternos presentes en las células de las copas endometriales (Allen, 1975; Allen et al, 1993). A su vez, las reducidas concentraciones de progesterona en las yeguas gestantes con burro se deben a la falta de apoyo gonadotrópico por parte de la eCG, una de cuyas funciones principales es la estimulación del cuerpo lúteo para la producción de progesterona (Squires y Ginther, 1975; Bergfelt et al, 1989; Urías, 2008).

La administración de PGF2 α no afectó la secreción posterior de eCG, ya que tanto en las yeguas gestantes con feto equino como en las yeguas gestantes con feto mula las concentraciones de ésta hormona se mantuvieron sin cambio durante las 72 horas posteriores al tratamiento (Figura 1). Esto concuerda con el concepto generalmente aceptado de que las copas endometriales producen eCG en forma constitutiva, y que la administración de diversas hormonas no afecta su producción (Hamilton et al, 1973; Nett y Picket, 1979; Thompson et al, 1982). También es compatible con los hallazgos de que las copas endometriales se mantienen funcionales aún en ausencia de un feto viable (Squires et al., 1980; Jeffcott et al., 1987).

En cambio, tanto en las yeguas gestantes con caballo (Figura 3) como en las yeguas gestantes con burro (Figura 4) la administración de PGF2 α sí provocó un descenso inmediato en las concentraciones de progesterona, que para las 18 horas post-tratamiento ya eran significativamente menores que las de las yeguas testigo de cada tipo de gestación. El efecto luteolítico de la PGF2 α en la yegua vacía es ampliamente conocido (Roser et al, 1982; Roser & Evans, 1983; Squires et al, 1993; Beg et al, 2005), pero en la yegua gestante no está tan bien caracterizado, aunque sí se sabe que las yeguas gestantes son menos susceptibles a la administración de una dosis estándar de PGF2 α , por lo que se requieren dosis repetidas (Ginther, 1992) como las utilizadas en el presente trabajo.

Se ha asumido que la resistencia de la yegua gestante a la luteolisis provocada por la PGF2 α es debida al efecto luteotrópico o luteoprotector de la eCG (Allen, 2001), lo que parece ser confirmado por los resultados del presente trabajo, en el que el tiempo requerido para que las concentraciones de progesterona alcanzaran niveles estadísticamente indistinguibles de 0 fue mucho mayor en las yeguas gestantes con feto equino (96 horas, Figura 3), que en las yeguas gestantes con feto mula (24 horas, Figura 4). Como resultado, las yeguas gestantes con feto mula, que no estaban protegidas por concentraciones elevadas de eCG (Figura 1) requirieron de una sola inyección de PGF2 α para reducir sus concentraciones de progesterona a niveles basales (Figura 4), mientras que en las yeguas gestantes con feto equino esto solo ocurrió después de la cuarta inyección de la hormona luteolítica (Figura 3). La diferencia en el efecto luteoprotector de la eCG en ambos tipos de gestaciones se evidenció desde las primeras horas posteriores a la administración de PGF2 α , ya que en las yeguas gestantes con feto equino las concentraciones promedio de progesterona se redujeron al 50 % de sus valores iniciales durante las primeras 18 horas post-tratamiento, mientras que en las yeguas gestantes con feto mula las concentraciones de progesterona llegaron en el mismo periodo a ser menores al 25 % del valor inicial (Figura 5).

El efecto luteoprotector de la eCG se debe a que esta hormona provoca una mayor síntesis de progesterona mediante la estimulación del transporte de colesterol al interior de la membrana mitocondrial interna de la célula lútea (Devoto et al., 2002) lo que permite que la enzima P 450_{scc} segmente la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona, precursor directo de la progesterona (Watson et al., 2002). Cuando se ha formado la pregnenolona, las células lúteas proceden a transformar esta última en progesterona mediante la enzima 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa, la cual generalmente no necesita estimulación para su actividad esteroideogénica (Albretch y Daels, 1997).

Como se mencionó anteriormente, en el presente trabajo la administración de PGF2 α no alteró la secreción de eCG, lo cual es de especial relevancia pues permitió que la eCG continuara estimulando a los cuerpos lúteos aún después de ser expuestos a la PGF2 α . Esto podría explicar la aparente recuperación en las concentraciones de progesterona que se produjo en las yeguas gestantes con caballo entre las 36 y las 48 posteriores a la primera inyección de la PGF2 α (Figura 3), ya que en ese momento dichas yeguas mantenían concentraciones de eCG superiores a las 100 U.I./ml. En ellas la progesterona solamente continuó reduciéndose a partir de la segunda inyección de PGF2 α , cuando el incremento en la frecuencia de administración de la hormona fue capaz de vencer el efecto luteoprotector de la eCG. En cambio, en las yeguas gestantes con feto mula no se registró un periodo de recuperación en las concentraciones de progesterona después de la primera inyección de PGF2 α , lo que es compatible con la ausencia de eCG en la circulación.

En el presente trabajo tanto la muerte fetal como la expulsión de los fetos tendieron a ocurrir antes en las yeguas gestantes con feto mula que en las yeguas gestantes con feto caballo (figura 6). Esta situación podría deberse al mayor ritmo de disminución de las concentraciones de progesterona en las yeguas servidas con burro. Sin embargo, debe reconocerse que las

diferencias en los intervalos desde el tratamiento a la muerte fetal y a la expulsión no fueron estadísticamente significativas ($P>0.05$), por lo que sería conveniente aumentar el tamaño de la muestra para evaluar si la tendencia aparente encontrada en este trabajo es un efecto real o no. Otros autores han encontrado intervalos de 4 a 5 días entre la primera inyección de $\text{PGF}_{2\alpha}$ hasta el aborto en yeguas gestantes con feto equino, lo que es muy similar al intervalo de 120 horas (5 días) observado en el presente trabajo en el mismo tipo de gestación. Para el caso de las yeguas gestantes con feto mula no existen estudios previos similares, por lo que no es posible establecer una comparación.

8. CONCLUSION

Se concluye que las reducidas concentraciones de eCG presentes en las yeguas gestantes con feto mula resultan en una mayor susceptibilidad de los cuerpos lúteos de la gestación al efecto luteolítico de la PGF2 α , por lo que una sola inyección provoca el cese casi total de la función lútea, mientras que en las yeguas gestantes con feto equino se requieren la administración repetida de la hormona antes de que los cuerpos lúteos dejen de producir cantidades significativas de progesterona. Como resultado de lo anterior, la muerte fetal y la expulsión del producto tienden a ocurrir antes en las yeguas gestantes con feto mula.

9. LITERATURA CITADA

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

Albrecht BA, MacLeod JN, Daels PF Expression of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase, cytochrome P450 17α -hydroxylase/ $17,20$ -lyase and cytochrome P450 aromatase enzymes in corpora lutea of diestrous and early pregnant mares. *Theriogenology*. 2001; 55: 551-561

Alcántara B, Boeta M. y Porras A. Luteolysis, estrus induction, and clinical side effects in mares treated with a PGF 2α analog, Cloprostenol (Sincrorel 11-219). *J Eq Vet Sci* 2005; 25 (9): 384-386.

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

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

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

Allen WR Some observations on pseudopregnancy in mares. *Br Vet J*. 1978;134(3):263-269.

Allen WR. Hormonal control of early pregnancy in the mare. *Vet Clin North Am Large Anim Pract*. 1980;2(2):291-302

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

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

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

Allen WR, Skidmore JA y Antezak DF. Interespecies and extraespecies equine pregnancies. In: McKinnon, A. O. y Voss. *Equine Reproduction*. Lea and Febiger. Philadelphia. 1993; 536-553.

Allen WR, Short RV. Interspecific and extraspecific pregnancies in equids: anything goes. *J Hered* 1997; 88: 384-392.

Allen WR. The physiology of early pregnancy in the mare. Proceedings Am Assoc Eq Pract 2000; 46: 338-354

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

Allen WR and Stewart F. Equine placentation. Reprod Fertil Dev 2001; 13: 623-634

Allen WR. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. Reprod Domest Anim 2001; 36: 121:131.

Amoroso EC. Placentation. In Parkes AS (ed) Marshall's physiology of reproduction. Longmans, Green and Co LTd, London. 1952: 127-311

Antczak DF, Miller JM, Remick LH. Lymphocyte alloantigens of the horse. II Antibodies to ELA antigens produced during equine pregnancy. J Reprod Immunol 1984;6:283-297

Antczak DF, Allen WR Maternal immunological recognition of pregnancy in equids. J Reprod Fertil Suppl. 1989;37:69-78

Azmi TI and O'Shea JD Mechanism of deletion of endothelial cells during regression of the corpus luteum. Lab Invest 1984;51: 206-217.

Bao B, and Garverick HA. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. J Anim Sci. 1998;76:1903-1921.

Barker C, Echeverria K, Davis M Whisnant CS, Pinto CRF Effects of different doses of PGF2 α on luteal function and on the subsequent estrous cycle. Anim Reprod Sci. 2006; 94:207-209

Battut I, Colchen S, Fieni F, Tainturier D and Bruyas JF. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. Equine Vet J 1998;25(Suppl) :60-62

Batra S. Effect of estrogen and progesterone treatment on calcium uptake by the myometrium and smooth muscle of the lower urinary tract. Eur J Pharmacol 1986; 127: 37-42.

Beg MA, Gastal EL, Gastal MO, Ji S, Wiltbank MC, Ginther OJ Changes in steady state concentrations of messenger ribonucleic acids in luteal tissue during prostaglandin F2 α induced luteolysis in mares. Anim Reprod Sci 2005; 90: 273-285

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

Berglund LA, Sharp DC, Vernon MW and Tatcher WW. Effect of pregnancy and collection techniques on prostaglandin F in the uterine lumen on pony mares. *J Reprod Fertil Suppl* 1982;32:335-341

Betteridge KJ, Renard A and Goff AK Uterine prostaglandin release relative to embryo collection, transfer procedure and maintenance of the corpus luteum. *Equine Vet J Suppl* 1985;3:25-33

Betteridge KJ. The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. *Equine Vet J Suppl* 1989; 8: 892–100

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

Boeta M. y Zarco L. Progesterone and equine chorionic gonadotropin concentrations around the time of pregnancy loss in mares impregnated by donkeys or stallions. *J Equine Vet Sci* 2005; 25 (12): 531-538.

Boeta M. Efecto de la época del año sobre la funcionalidad de las copas endometriales y la secreción de eCG en yeguas utilizadas para la producción de mulas. (Tesis de Maestría) México DF. FMVZ – UNAM, 2008

Bristol F Control of the mare's reproductive cycle. *Proceedings Annual meeting Society theriogenology.* Hastings 1987; 309-321

Catchpole HR, Lyons WR. The gonad-stimulating hormone of pregnant mares. *Am J Anat* 1934; 55: 167

Cole HH, Hart GH, The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. *Am J Physiol* 1930. 93: Pp. 57-61

Cole HH, Penchars RL, Goss H. On the biological properties of highly purified gonadotrophin from pregnant mare serum. *Endocrinology.* 1946;27:548

Cole HH, Bigelow M, Finkel J, Rupp GR. Biological half life of endogenous PMS following hysterectomy and studies on losses in urine and milk. *Endocrinology.* 1967; 81:927

Couet J, Martel C, Dupont E, Luu-The V, Sirard MA, Zhao HF, Pelletier G and Labrie F. Changes in 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase messenger ribonucleic acid, activity and protein levels during the estrous cycle in the bovine ovary. *Endocrinology,* 1990;127: 2141-2148

Christakos S and Bahl OP. Pregnant mare serum gonadotropin. Purification and physicochemical, biological and immunological characterization. *J Biol Chem* 1979;254(10):4253-4261

Clegg MT, Boda JM, Cole HH. The endometrial cups and allantochorionic pouches in the mare with emphasis on the source of equine gonadotrophin. *Endocrinology*. 1954;54:448

Daels PF, Mohammed Hussni, Montavon SMN., Stabenfeldt GH, Hughes JP, Odensvik K y Kindahl H. Endogenous prostaglandin secretion during cloprostenol-induced abortion in mares. *Anim Reprod Sci* 1995;40:305-321.

Daels P. F., Stabenfeldt G. H., Kindahl H. y Hughes J. P. Prostaglandin release and luteolysis associated with physiological and pathological conditions of the reproductive cycle of the mare: a review. *Equine Vet J Suppl* 1989;8:29-34.

Daels PF, De Moraes JJ, Stabenfeldt GH, Hughes JP, Lasley BL. The corpus luteum: source of oestrogen during early pregnancy in the mare. *J Reprod Fertil Suppl*. 1991;44:501-508.

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

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

Denker HW, Betteridge KJ and Sirois J. Shedding of the capsule and proteinase activity in the horse embryo *J Reprod Fertil Suppl* 1987;35:703

Douglas R. H., E. L. Squires y O. J. Ginther. Induction of abortion in mares with prostaglandin. *J Anim Sci*. 1974; 39: (2).

Enders AC, Liu IKM. Trophoblast-uterine interactions during equine chorionic girdle cell maturation, migration and transformation. *Am J Anat* 1991;192:366-381

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

Evans KL, Kasman, LH and Hughes, JP.. Pregnancy diagnosis in the domestic horse through urinary estrone conjugate analysis. *Theriogenology*.1984;22:615-620

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

Flint APF and Sheldrick A Ovarian secretion of oxytocin is stimulated by prostaglandin. *Nature*. 1982;119:219-227

Ginther OJ. Reproductive Biology of the Mare. McNaughton and Gunn. Ann Arbor, MI 1979 Pp 268

Ginther OJ. Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects. Cross Plains, WI: Equiservices; 1992

Ginther OJ. Equine pregnancy: Physical interactions between the uterus and conceptus. AAEP. Proceedings. 1998; 44: 73-104

Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO y Beg MA. Effect of PGF₂ α on ovarian, adrenal, and pituitary hormones and luteal blood flow in mares. Domest Anim Endocrinol 2007; 32: 315-328.

Girsh E, Milvae RA, Wang W, and Meidan R. Effect of endothelin-1 on bovine luteal cell function: role of PGF₂ α -induced antisteroidogenic action. Endocrinology. 1996;137:1306-1312.

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

Grummer RR and Carroll DJ. A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. J Anim Sci 1988;66:3160-3173.

Haluska GJ and Currie WB. Variation in plasma concentrations of oestradiol-17 β and their relationship to those of progesterone, 13,14 dihydro-15 keto prostaglandin F_{2a} and oxytocin across pregnancy and at parturition in pony mares. J Reprod Fertil. 1988;84:635-646

Hamilton DW, Allen WR, Moor RM The origin of equine endometrial cups III Light and electron microscopic study of fully developed equine endometrial cups. Anat Rec. 1973; 177:503

Hawkins DE, Belfiore CJ, Kile JP and Niswender GD. Regulation of messenger ribonucleic acid encoding 3-hydroxysteroid dehydrogenase/5- α -isomerase in the ovine corpus luteum. Biol Reprod 1993; 48: 1185-1190.

Hoffmann B, Gentz F, Failing K. Investigations into the course of Progesterone-, Oestrogen- and eCG-concentrations during normal and impaired pregnancy in the mare. Reproduction of Domestic Animals. 1996;31:717-723

Holtan DW, Nett TM and Estergreen VL Plasma progestin in pregnant, postpartum and cycling mares. J Anim Sci. 1975; 40: 251-260

Jeffcott B. L., Hyland H. J., MacLean A. A., Dyke T y Robertson-Smith G. Changes in maternal hormone concentrations associated with induction of fetal death at day 45 of gestation in mares. J Reprod Fertil Suppl 1987;35: 461-467.

Juengel JL, Meberg BM, Turzillo AM, Nett TM and Niswender GD, Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea, *Endocrinology* 1995;136:5423–5429

Keifer BL, Roser JF, Evans JW Neely DP and Pacheco CA Progesterone patterns observed with multiple injections of a PGF – 2alpha analogue in the cyclic mare. *J Reprod Fertil Suppl* . 1979;27:237-244.

Kindahl H, Knudsen O, Madej A, Edqvist LE. Progesterone, prostaglandin F2 alpha, PMSG and oestrone sulphate during early pregnancy in the mare. *J Reprod Fertil Suppl*1982;32:353-359.

Kooistra L, Ginther OJ Termination of pregnancy by administration of prostaglandin F2 α and termination of early pregnancy by administration of prostaglandin F2 α or colchicine or by removal of embryo in mares. *Am J Vet Res* 1976;37:35-39

Kydd JH, Butcher GW, Antczak DF, Allen WR. Expression of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules on early trophoblast. *J Reprod Fertil Suppl*. 1991; 44: 463-477.

Lestavel S and Fruchart JC. Lipoprotein receptors. *Cellular Molecular Biology* 1994;40: 4461-4481.

Li X, Peegel H and Menon KM , In situ hybridization of high density lipoprotein (scavenger, type 1) receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) during folliculogenesis and luteinization: evidence for mRNA expression and induction by human chorionic gonadotropin specifically in cell types that use cholesterol for steroidogenesis. *Endocrinology*. 1998;139:3043–3049

Liotta L, Rao CN and Wewer UM. Biochemical interaction of tumor cells with the basement membrane. *Annu Rev Biochem*. 1986;55:1037–1057

Licht P, Bona Gallo A, Aggarwal BB, Farmer SW, Castelino JB and Papkoff H. Biological and binding activities of equine pituitary gonadotrophins and pregnant mare serum gonadotrophin. *J Endocrinol* 1979; 83(3):311-322

Madej A, Kindahl H, Nydahl C, Edqvist LE and Stewart DR. Hormonal Changes associated with induced late abortions in the mare. *J Reprod Fertil Suppl* 1987; 35: 470-484.

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

Martin JL, Saltiel A, Evans JW. Progesterone synthesis by different types of corpora lutea during the first 198 days of pregnancy. *J Equine Vet Sci*. 1989; 9:84–87.

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

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

Maslar IA, Powers-Craddock P and Ansbacher R. Decidual prolactin production by organ cultures of human endometrium: effects of continuous and intermittent progesterone treatment. Biol Reprod 1986; 34: 741-750

Matteri RL, Papkoff H, Murthy HMS, Roser JF, Chang Y-S. Comparison of the properties of highly purified equine chorionic gonadotropin isolated from commercial concentrates of pregnant mare serum and endometrial cups. Domest Anim Endocrinol 1986; 3: 39

McCracken JA, Smith TT, Lamsa JC and Robinson AG. The effect of estradiol -17 β (E) and progesterone (P) on oxytocin (OT) pulse generator in the ovariectomized sheep. Biol Reprod . 1991; 44 Suppl 1. Abstract 137

McGuire WJ, Juengel JL, and Niswender GD. Protein kinase C second messenger system mediates the antisteroidogenic effects of prostaglandin F₂ in the ovine corpus luteum in vivo. Biol Reprod . 1994;51:800-806.

Meyers PJ Methods of controlling and synchronising oestrus in the mare. Equine Veterinary Education 1993;5(5):262-266

Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. Physiol Rev. 1993;73:161-189

Miller PA, Lauderdale JW and Geng S. Effects of Various Doses of Prostin F2 Alpha® on Estrous Cycles, Rectal Temperature, Sweating, Heart Rate and Respiration Rate in Mares. J Anim Sci 1976;42:901-911.

Moor RM, Allen WR, Hamilton DW. Origin and histogenesis of equine endometrial cups. J Reprod Fertil Suppl. 1975;23:391

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

Neely DP, Kindahl H, Stabenfeldt GH, Edqvist LE and Hughes JP. Prostaglandin release patterns in the mare: physiological, pathophysiological and therapeutic responses. J Reprod Fertil Suppl 1979;27:181-189

Nelson AM. The therapeutic activity, post-treatment fertility and safety of prostaglandin F₂alpha-Tham salt in clinically anoestrous mares: a review. Equine Vet J. 1976; 8(2):75-77

Nett TM, Pickett BW. Effect of diethylstilboestrol on the relationship between LH, PMSG and progesterone during pregnancy in the mare. *J Reprod Fertil Suppl.* 1979;27:465

Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, and McIntush EW. Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum *Physiol Rev*, 2000;80(1):1-29

Paccamonti DL. Elective termination of pregnancy in mares. *J Am Vet Med Assoc.* 1991;198(4):683-689.

Papkoff H, Samy TSA. Isolation and partial characterization of the polypeptide chains of ovine interstitial cell – stimulating hormone. *Biochim Biophys Acta.* 1967:147-175

Papkoff H. Chemical and biological properties of the subunits of pregnant mare serum gonadotrophin. *Biochem Biophys Res Commun* 1974;58:397-404

Papkoff H and Bewlwy TA and Ramachandran J. Physicochemical and biological characterization of pregnant mare serum gonadotropin and its subunits. *Biochim Biophys Acta* 1978; 532:185.

Papkoff H, Farmer SW and Cole, HH . Isolation of a gonadotropin (PMEG) from pregnant mare endometrial cups: Comparison with PMSG. *Proceedings Society Experimental Biological Medicine* 1978b;158:373-377.

Pate JL. Cellular components involved in luteolysis. *J Anim Sci* 1994;72:1884-1890

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

Pashen RL. Maternal and fetal endocrinology during late pregnancy and parturition in the mare. *Equine Vet J.* 1984;16:233-238

Phariss BB, Cornette JC and Gutnecht GD. Vascular control of luteal steroidogenesis. *J Reprod Fertil Suppl* 1970;10:97-103.

Pierce JG, Parsons TF Glycoprotein hormones: structure and function *Annual Review Biochemistry.* 1981;50:465

Pon LA and Orme-Johnson NR. Acute stimulation of steroidogenesis in corpus luteum and adrenal cortex by peptide hormones. Rapid induction of a similar protein in both tissues. *J Biol Chem.* 1986; 261: 6594–6599

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

Rajapaksha WR, McBride M, Robertson L and O'Shaughnessy PJ. Sequence of the bovine HDL-receptor (SR-BI) cDNA and changes in receptor mRNA expression during granulosa cell luteinization in vivo and in vitro. *Mol Cell Endocrinol*. 1997;134:59–67.

Richards JS, Jahnsen T, Hedin L, Lifta J, Ratoosh J, Durita JM, and Goldring NB. Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent Program of Hormonal Research*. 1987;43: 231-276.

Roser JF, Evans JW, Mikuckis GM, Adams TE and Hughes JP, Effect of PGF₂α on LH receptors in the equine corpus luteum. *J Reprod Fertil Suppl*. 1982;32: 235–245

Roser JF and Evans JW, Luteal luteinizing hormone receptors during postovulatory period in the mare. *Biol Reprod* 1983;29 :499–510

Rossdale PD, Silver M. The concept of readiness for birth. *J Reprod Fertil Suppl*. 1982;32:507-510.

Sawyer HR, Niswender KD, Braden TD and Niswender GD. Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF₂α. *Domest Anim Endocrinol* 1990;7:229-238.

Saint-Dizier M, Chopineu M, Dupont J, Daels PF, Combarnous Y: Expression and binding activity of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in the primary corpus luteum during early pregnancy in the mare. *Biol Reprod* . 2003;66:1743-1749.

Samuelsson B. Prostaglandins, thromboxanes and leucotrienes: formation and biological roles. *The Harvey lectures* 75, 1-40

Sharp DC, McDowell KJ, Weithenauer J, Thatcher WW. The continuum of events leading to maternal recognition of pregnancy in mares. *J Reprod Fertil Suppl*. 1989;37:101-107.

Silvia WJ The role of uterine and ovarian hormone in luteolysis: a comparison among species. *Reproduction of Domestic Animals*. 1999;34:317-378

Simpson ER and Waterman MR. Regulation by ACTH of steroid hormone biosynthesis in the adrenal cortex. *Can J Biochem Cell Biol* 1983;61: 692-707.

Skidmore JA, Boyle MS, Allen WR. Micromanipulation of equine embryos to produce monozygotic twins. *Equine Vet J Suppl*. 1989;8:126-128.

Squires EL, Garcia MC, and Ginther OJ, Effects of pregnancy and hysterectomy on the ovaries of pony mares. *J Anim Sci* 1974;38(4):823-830

Squires EL, Wentworth BC, Ginther OJ. Progesterone concentration in blood of mares during the estrous cycle, pregnancy and after hysterectomy. *J Anim Sci* 1974; 39:759–767.

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

Squires EL and Ginther OJ. Follicular and luteal development in pregnant mares. *J Reprod Fertil Suppl.* 1975;23:429-233

Squires EL, Stevens WB, Pickett BW, Nett TM. Role of pregnant mare serum gonadotropin in luteal function of pregnant mares. *Am J Vet Res* 1978;40:889-891

Squires EL, Hillman RB, Pickett BW and Nett TM. Induction of abortion in mares with Equimate: Effect on secretion of progesterone, PMSG and reproductive performance. *J Anim Sci* 1980; 50:490-495.

Squires EL and Bosu WTK. Induction of abortion in mares during early to midgestation. In McKinnon AO and Voss JL *Equine reproduction*. Lea and Febiger. Philadelphia. 1993:563-566

Stabenfeldt GH, Kindahl H, Hughes JP, Neely DP, Liu I, Pascoe D. Control of luteolysis in the mare. *Acta Vet Scan Suppl.* 1981;77:159-70

Starbuck GR, Stout TAE, Lamming GE, Allen WR and Flint APF. Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the oestrous cycle and early pregnancy. *J Reprod Fertil.* 1998;113: 173-179

Steven DH, Samuel CA. Anatomy of the placental barrier in the mare. *J Reprod Fertil Suppl.* 1975;23:579-82.

Stevenson KR, Parkinso TJ and Wathes DC Measurement of oxytocin concentrations in plasma and ovarian extracts during the oestrous cycle of mares. *J Reprod Fertil.* 1991;93:437-441

Stewart F, Allen WR and Moor RM Influence of foetal genotype on the follicle – stimulating hormona luteinizing hormona ratio of pregnant mare serum gonadotrophin. *J Endocrinol.* 1977;73:419-425

Stewart F and Allen WR Biological functions and receptor bindings activities of equine chorionic gonadotrophins. *J Reprod Fertil.* 1981;62:527-536

Stout TAE, Lamming GE, Allen WR. The uterus as a source of oxytocin in cyclic mares. *J Reprod Fertil.* 2000;56:281-287.

Strauss JF III, Schuler LA, Rosenblum MF and Tanaka T. Cholesterol metabolism by ovarian tissue. *Advanced Lipid Research.* 1981;18:99–157.

Strinden ST and Shapiro SS. Progesterone-altered secretory proteins from cultured human endometrium. *Endocrinology* 1983;112: 862-870.

Sugino H, Bousfield GR, Moore Jr WT and Ward DN. Structural studies on equine glycoprotein hormones. *J Biol Chem.* 1987;262:8603-8609

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

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

Trzeciak WH and Boyd GS Activation of cholesterol esterase in bovine adrenal cortex. *Eur J Biochem.* 1974; 46: 201-207.

Tsai SJ and Wiltbank MC. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ induces expression of prostaglandin G/H synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. *Biol Reprod .* 1997;57:1016–1022

Tsai SJ and Wiltbank MC. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. *Biol Reprod .* 1998;58:346–352

Tsai SJ, Kot K, Ginther OJ and Wiltbank MC. Temporal gene expression in bovine corpora lutea after treatment with $PGF_{2\alpha}$ based on serial biopsies in vivo. *Reproduction.* 2001;121:905–913

Urías CJ. Papel de la gonadotropina corionica equina en la estimulación de la esteroidogenesis durante la gestación equina. (Tesis de Maestría) México, DF. FMVZ – UNAM, 2008

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

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

van Niekerk CH and Allen WR. Early embryonic development in the horse *J Reprod Fertil Suppl.* 1975;23:495–498

Vanderwall DK, Betschart RW and Squires EL. Effect of $PGF_{2\alpha}$ and 13,14dihydro 15 keto $PGF_{2\alpha}$ (PGFM) on corpora luteal function in nonpregnant mares. *Theriogenology* 2000;53:1263-1271

Vernon MW, Strauss S, Simonelli M, Zavy MT, Sharp DC. Specific $PGF_{2\alpha}$ binding by the corpus luteum of the pregnant and non-pregnant mare. *J Reprod Fertil Suppl.* 1979;27:421-429.

Watson ED, Bjorkstein TS, Buckingham J and Nikolakopoulos E. Immunolocalisation of oxytocin in the uterus of the mare. J Reprod Fertil Abstract Series 1997;20:31

Watson ED, Thomson SRM, Howie AF Detection of steroidogenic acute regulatory protein in equine ovaries. J Reprod Fertil. 2000;119:187-192

Webb R, Woad KJ and Armstrong DG. Corpus luteum (CL) function: local control mechanisms. Domest Anim Endocrinol. 2002;23:277-285

Weber JA, Freeman DA, Vanderwall DK and Wood GL. Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. Biol Reprod 1991;45:540-543

Zarco L, Stabenfeldt GH, Quirke JF, Kindahl H and Bradford GE. Release of prostaglandin F2 α and the timing of events associated with luteolysis in ewes with oestrous cycles of different lengths. J Reprod Fertil. 1988;83:517-526.
J Reprod Fertil.