



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

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

**DESARROLLO FOLICULAR EN
GESTACIONES EQUINAS Y MULARES
TRATADAS CON UN ANTAGONISTA DE GnRH**

T E S I S

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

P R E S E N T A :

CIRCE ISMEN COSTILLA ARIAS

TUTOR:

PhD. LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO

COMITÉ TUTORAL:

DRA. ANA MYRIAM BOETA ACOSTA

PhD. MA. TERESA SÁNCHEZ TORRES ESQUEDA

México, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DECLARACIÓN

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

Circe Ismen Costilla Arias

DEDICATORIAS

A MI FAMILIA

Papiro y Resi: les dedico con todo mi amor un logro más en mi vida, porque son mi ejemplo a seguir, este triunfo es suyo, porque mi vida y lo que le acontece les pertenece!!!

Yoyo y beto: gracias por darle alegría, sonrisas y carcajadas a mi vida, con cariño Vurro Ortega ó Jumentina Vargas como quieran jeje!!

Mi cielo: gracias por seguir a mi lado en una etapa más de mi vida, por aguantar mis hormonas y apoyarme con tu amor y cariño en todo momento, te amooo!!

Abue chago, abue juanita, tío mauri, tía male, tavo, chucho, neydi, evatin y axel: estoy orgullosa de pertenecer a esta hermosa familia, porque de cada uno de ustedes he obtenido grandes herramientas para ser lo que ahora soy, gracias por estar siempre al pendiente mío, cuidarme y apoyarme.

A MIS AMIGOS Y COLEGAS

Lulú, Yazmín, Yola, Dulce, Martha, Lauris, gracias por soportar mi carácter, gracias por estar a mi lado cuando más los necesite, gracias por jalarme las orejas, por ese apoyo incondicional simplemente gracias por tan bella amistad!!!

También gracias a Silene, Ari, Sheila, Bruno, Karlita, Toño Sandoval, Toño Valencia, Álvaro, Arnulfo, Neto, Ardillita, Rubén, Angy y trío perfecto (Martín, Carlos y Luis quito), a todos ustedes gracias por sus pequeños detalles y compañerismo!!

A G R A D E C I M I E N T O S

A Dios

A mi Universidad Nacional Autónoma de México

A mi Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mi maestría.

A mi Comité Académico y Jurado: Ma. Teresa Sánchez Esqueda, Myriam Boeta Acosta, Javier Valencia, Joel Hernández, Jaime Gallegos y Juan Salazar, gracias por sus conocimientos compartidos, por su paciencia y apoyo para realizar un paso más en mi vida.

Y muy especialmente gracias doctor Luis Alberto Zarco Quintero por enseñarme a ser independiente, a lograr mis objetivos, le admiro y respeto sobre todo por su don de tranquilizar cuando uno está más estresado jeje!!

A Susi Rojas y Anita Rodríguez por las clases brindadas, gracias por su apoyo y paciencia en las determinaciones hormonales en el laboratorio.

A MIS COMPAÑEROS DE TRABAJO

Dany, Adriana, Luis, Erick, Iván, Mariana, Jimena, Ramón, Tico y Luciana, gracias por soportar mis berrinches, ratos de histeria, presión, corajes, etc., les agradezco mucho su apoyo en el Rancho San Francisco para realizar este trabajo. Gracias porque juntos aprendimos, nos equivocamos y salimos adelante, gracias por las risas, las travesuras, los llantos y las inolvidables vivencias en esta etapa de mi vida!!!

Y por supuesto agradezco a Martina, Sarabi, Rámula, Nieves, Gris, Centella, Paloma, Manchitas, Candela, Tomasa, Linda, Gloria, Angustias, Pituka, Kedita, Viviana, Lince, Isabel, Bronco y Pancho por su cooperación involuntaria para realizar este trabajo jeje!!

RESUMEN

Desarrollo folicular en gestaciones equinas y mulares, tratadas con un antagonista de GnRH.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el desarrollo folicular, así como las concentraciones de estradiol y eCG, durante y después de la aplicación del tratamiento con un antagonista de GnRH (Antarelix) tanto en gestaciones equinas como mulares. Se utilizaron 17 yeguas criollas asignadas al azar en dos grupos con base en el semental usado para darles servicio con caballo (n=9) o con burro (n=8). A los 12 días posteriores al servicio se diagnosticó la gestación por ultrasonografía y se monitoreó el desarrollo folicular cada tercer día, registrando aquellos folículos mayores a 20 mm y verificando la viabilidad fetal mediante latido cardíaco, movimiento fetal y/o pulsación del cordón umbilical del producto. Del día 30 de la gestación al día 100 se tomaron muestras de sangre mediante venopunción de la vena yugular para la determinación de las concentraciones de estradiol y eCG en plasma por enzimoimmunoensayo (ELISA) en placas de microtitulación. En el día 39 post-ovulación a ambos tipos de gestaciones se les administró el antagonista de GnRH Antarelix (D-Nal, D-Phe, D-Pal, 4, Phe, D-Hcit, 7, Lys (iPr), 9, D-Ala) a una dosis de 0.01 mg/kg por vía intravenosa diariamente por 7 días y después se aplicó por vía subcutánea en dosis de 0.07 mg/kg una vez a la semana durante 5 semanas. Las concentraciones de eCG fueron menores en las yeguas servidas con burro en comparación con las yeguas servidas con caballo, siendo más evidente la diferencia durante el tiempo de tratamiento. El desarrollo y volumen de folículos mayores a 20 mm se suprimieron rápida y completamente en las gestaciones mulares (en las cuales la secreción de eCG fue deficiente), sugiriendo que el Antarelix logró suprimir la secreción de LH hipofisiaria, por lo que en ausencia tanto de LH como de eCG no se pudo mantener el desarrollo folicular. En las gestaciones equinas tanto las concentraciones de eCG como el volumen y el desarrollo folicular no se vieron afectados por el tratamiento, sin embargo la ovulación y/o luteinización de los folículos se vio alterada dando como resultado folículos anovulatorios hemorrágicos (FAH's) únicamente en este tipo de gestación, sugiriendo que la eCG puede mantener el desarrollo folicular, pero no es capaz por sí misma de inducir la ovulación como lo haría la LH hipofisiaria. No se observó relación alguna entre las concentraciones de estradiol y eCG. El análisis de los resultados de esta investigación sugiere que durante la gestación equina la eCG juega un papel de apoyo en el desarrollo folicular, pero aún sigue requiriéndose de la LH hipofisiaria para mantener una función folicular normal y lograr la ovulación y/o luteinización de los folículos que se desarrollan durante la gestación.

Palabras clave: desarrollo folicular, antagonista de GnRH, LH, FSH, gestación equina, gestación mular.

ABSTRACT

Follicular development in equine and mule pregnancies, treated with a GnRH antagonist. The present study aims to assess follicular development, and concentrations of estradiol and eCG, during and after treatment with a GnRH antagonist (Antarelix) in both horse and mule pregnancies. Seventeen mares were randomized into two groups based on the male used to service them, horse (n = 9) or donkey (n = 8). Pregnancy was diagnosed by ultrasonography at 12 days after service and follicular development was monitored every third day, recording those follicles greater than 20 mm and verifying fetal viability by heart beat, fetal movement and / or umbilical cord pulsation of the product. From day 30 of gestation to day 100, blood samples were taken by vein puncture from the jugular vein to determine concentrations of estradiol and eCG in plasma by enzyme immunoassay (ELISA) in microtiter plates. On day 39 post-ovulation the GnRH antagonist Antarelix (Ac-D-Nal, D-Phe (pCl), D-Pal, Ser, Tyr, D-Hci, Leu, Lys-(iPr), Pro, D-Ala-NH₂) was administered to all the animals at a daily intravenous dose of 0.01 mg / kg for 7 days and then applied subcutaneously at a dose of 0.07 mg/kg once a week during 5 weeks. Concentrations of eCG were lower in mares served with donkey in comparison with mares served with horse, being more evident the difference during the time of treatment administration. The development and size of follicles larger than 20 mm was quickly and completely suppressed in mule pregnancies (in which eCG secretion was deficient), suggesting that Antarelix managed to suppress pituitary LH secretion, so that in the absence of both LH and eCG follicular development could not be maintained. In equine pregnancies, the concentrations of eCG, follicular volume and development were not affected by treatment. However, ovulation and/or luteinization of follicles was altered, resulting in hemorrhagic anovulatory follicles (HAF's) only in this type of pregnancy, thus suggesting that eCG is able to maintain follicular development, but not to induce ovulation, as pituitary LH would. No relation was found between concentrations of estradiol and those of eCG. The results of this study suggest that during equine pregnancy, eCG plays a supporting role in follicular development, but pituitary LH is still required to maintain a normal follicular function culminating in ovulation and/or luteinization of follicles developed during pregnancy.

Key words: follicular development, GnRH antagonist, LH, FSH, equine pregnancy, pregnancy mules.

C O N T E N I D O	Página
DECLARACIÓN.....	I
DEDICATORIAS.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
1.INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	5
3. OBJETIVOS.....	5
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
4.1 Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).....	6
4.2 Antagonistas de GnRH.....	6
4.3 Foliculogénesis.....	12
4.3.1 Tipos de oleadas foliculares.....	13
4.3.2 Papel de hormonas y factores del crecimiento en la foliculogénesis.....	13
4.3.2.1 Hormona liberadora de gonadotropinas (FSH).....	13
4.3.2.2 Hormona luteinizante (LH).....	15
4.3.2.3 Factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF) y factor de crecimiento tumoral (TGF).....	15
4.3.2.4 Inhibina y activina.....	16
4.3.2.5 Estrógenos.....	16
4.3.3 Foliculogénesis inicial.....	17
4.3.4 Foliculogénesis dependiente de gonadotropinas.....	19
4.3.4.1 Reclutamiento folicular.....	20
4.3.4.2 Selección folicular.....	21
4.3.4.3 Dominancia folicular.....	22
4.4 Desarrollo folicular en la yegua gestante.....	24
4.5 Endocrinología de la gestación equina temprana.....	25
4.5.1 Estrógenos.....	25

4.5.2 Progesterona (P4).....	27
4.5.3. Gonadotropina coriónica equina (eCG).....	28
4.5.3.1. Estructura de la eCG.....	29
4.5.3.2. Actividad Biológica.....	30
4.5.3.3. Función de la eCG en la gestación equina.....	31
4.5.3.4. Secreción de la eCG en la gestación interespecie e intraespecie.....	32
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
5.1 Localización.....	35
5.2 Animales experimentales.....	35
5.3 Manejo ultrasonográfico.....	36
5.4 Tratamiento.....	36
5.5 Muestreo de sangre y procesamiento de muestras.....	38
5.6 Análisis estadístico.....	38
6. RESULTADOS.....	39
6.1 Comparación entre yeguas servidas con caballo (gestaciones equinas) y yeguas servidas con burro (gestaciones mulares).....	39
6.1.1 Concentraciones de eCG.....	39
6.1.2 Desarrollo folicular.....	40
6.1.3 Folículos anovulatorios hemorrágicos (FAH's).....	41
6.1.4 Volumen folicular (incluyendo FAH's).....	41
6.1.5 Volumen folicular (excluyendo FAH's).....	42
6.1.6 Concentraciones de estradiol.....	43
6.2 Comparaciones hormonales entre las yeguas que abortaron y las que mantuvieron una gestación normal.....	44
6.2.1 Concentraciones de eCG.....	44
6.2.2 Concentraciones de estradiol.....	45
6.2.3 Desarrollo folicular.....	46
6.2.4 Volumen folicular.....	47
7. DISCUSIÓN.....	49
8. CONCLUSIONES.....	53
9. LITERATURA CITADA.....	54

	ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1	Mecanismos de acción de análogos de GnRH, antagonistas vs agonistas.	8
Figura 2	Diagrama que muestra las actividades realizadas durante el experimento.	37
Figura 3	Concentraciones medias de eCG entre la semana 4 y 16 de la gestación en yeguas servidas con caballo ó con burro.	39
Figura 4	Número promedio de folículos mayores a 20 mm de diámetro entre la semana 4 y 16 de la gestación en yeguas servidas con caballo ó con burro.	40
Figura 5	Número promedio de folículos anovulatorios hemorrágicos (FAH's) que aparecieron durante la semana 4 a 15 de la gestación en yeguas servidas con caballo.	41
Figura 6	Volumen folicular promedio entre las semanas 4 y 16 de la gestación en yeguas servidas con caballo ó con burro.	42
Figura 7	Volumen folicular promedio (excluyendo FAH's) de la semana 4 a la 16 de la gestación en yeguas servidas con caballo ó con burro.	43
Figura 8	Concentraciones promedio de estradiol entre la semana 4 y 16 de la gestación en yeguas servidas con caballo ó con burro.	44

Figura 9	Concentraciones promedio de eCG en gestaciones mulares de la semana 4 a la 16 en yeguas con gestaciones normales y en yeguas que abortaron.	45
Figura 10	Concentraciones promedio de estradiol en gestaciones mulares de la semana 4 a la 16 en yeguas que tuvieron gestación normal y en yeguas que abortaron.	46
Figura 11	Número promedio de folículos mayores a 20 mm de diámetro en gestaciones mulares de la semana 4 a la 16 en yeguas que mantuvieron la gestación y en yeguas que abortaron.	47
Figura 12	Volumen folicular promedio de la semana 4 a la 16 en gestaciones mulares en yeguas con gestación normal y en yeguas que abortaron.	48

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo folicular es un proceso continuo que culmina con la ovulación del folículo maduro, con la formación de un folículo anovulatorio hemorrágico (FAH) o con atresia folicular. Se caracteriza por el desarrollo de oleadas foliculares periódicas que a menudo implican la selección de un solo folículo dominante. En el ciclo estral de la yegua se presentan dos oleadas foliculares: una mayor (primaria y secundaria) y una menor dependiendo de si se genera un folículo dominante mayor a 30 mm o si sólo se generan folículos subordinados (menores a 30 mm). La oleada mayor empieza al final del diestro, cuando se genera el folículo dominante, que si es estimulado apropiadamente, completará su desarrollo y liberará un ovocito fértil. La oleada menor se inicia en el estro tardío, resultando en la formación de folículos que después de unos días sufren atresia, aunque en el 12% de las yeguas pueden culminar en ovulaciones durante el diestro (Ginther, 1993). La regulación de la aparición de las oleadas foliculares y la selección del folículo dominante implican interacciones entre gonadotropinas circulantes y factores foliculares (Fortune et al., 2004).

Las oleadas foliculares se producen periódicamente durante la mayor parte de la vida post-natal en la yegua y sus características se ven influidas por factores como la etapa del ciclo estral, época del año, gestación, edad, raza y variaciones individuales.

En las diferentes etapas fisiológicas se generan distintos tipos de oleadas foliculares y diferentes niveles de actividad dentro de estas, originadas por cambios en los niveles de gonadotropinas y/o en la sensibilidad de los folículos a estas hormonas (Donadeu y Pedersen, 2008).

Durante las primeras semanas de la gestación, continúan las oleadas foliculares cada 10 a 12 días, siendo estimuladas por la hormona folículo estimulante (FSH) (Ginther y Bergfelt, 1992), por lo que entre el día 19 y 23 de la gestación se forman folículos maduros, que no llegan a ovular debido a que la progesterona proveniente del cuerpo lúteo (CL) primario impide la elevación preovulatoria de hormona luteinizante (LH) (Allen, 1984).

A partir del día 35 de la gestación, el desarrollo de las copas endometriales, resulta en una elevación en las concentraciones de gonadotropina coriónica equina (eCG), la cual actúa en los receptores para LH de los folículos dominantes, teniendo una acción luteotrópica. Por esta razón, a partir de ese momento algunas de las oleadas foliculares pueden culminar en ovulación, lo que resulta en la formación de cuerpos lúteos secundarios o por lo menos en la luteinización del folículo dominante formando cuerpos lúteos accesorios entre el día 35 y 80 de la gestación (Bergfelt et al., 1989; Allen y Stewart, 1993; Ginther, 1992). Ambos tipos de cuerpos lúteos, secundarios y accesorios, son referidos como suplementarios (Ginther, 1992). Además de inducir las ovulaciones secundarias y/o accesorias, la eCG también estimula tanto al cuerpo lúteo primario como a los suplementarios para la producción de progesterona hasta el día 120 ó 150 de la gestación (Allen, 2001), momento en el cual dichos cuerpos lúteos sufren regresión ya que deja de secretarse la eCG debido al rechazo inmunológico de las copas endometriales (Ginther y First, 1971; Squires et al., 1974a).

Las copas endometriales, son estructuras que se forman a partir de células del cinturón coriónico del embrión y que se desprenden del mismo, insertándose en el endometrio materno. Las copas endometriales comienzan a secretar eCG alrededor del día 32 a 35 de la gestación, alcanzando sus niveles máximos entre los días 60 y 70 (Allen, 2000) y desapareciendo de la circulación a más tardar en el día 120-150 debido al rechazo inmunológico de las copas endometriales (Roser y Lofsted, 1989; Boeta y Zarco 2005, 2010)

En el caso de las gestaciones intra-especie (caballo con yegua), la invasión de las copas endometriales por los leucocitos maternos comienza alrededor del día 80, mientras que en las gestaciones inter-especie (burro con yegua), comienza desde los 50 días de gestación (Allen, 1982), por lo que las concentraciones de eCG en este tipo de gestación son menores y desaparecen más rápidamente que en las gestaciones intra-especie. Estas bajas concentraciones de eCG en las gestaciones mulares provocan que se produzca menor cantidad de progesterona que en las yeguas que son gestadas con caballos (Boeta y Zarco, 2005, 2010).

Durante los dos primeros meses de la gestación, los estrógenos circulantes en la yegua son de origen ovárico. Desde el día de la ovulación (día 0) hasta el día 35 de la gestación (antes de que se inicie la secreción de eCG), los niveles séricos de estrógenos son similares a los de una yegua en diestro, pero entre el día 35 y 40 se incrementan sus concentraciones, para llegar a una meseta de 3 ng/ml entre los días 40 y 60 de la gestación, lo cual es una concentración aún mayor que las concentraciones preovulatorias en esta especie. Después del día 90, conforme la gestación avanza, las gónadas fetales comienzan a crecer y a secretar estrógenos, por lo que el estradiol circulante en la yegua a partir de este periodo gestacional es en su mayoría de origen feto-placentario (Terqui y Palmer, 1979).

En las yeguas gestantes, una proporción importante de los estrógenos es producida por el cuerpo lúteo a partir de la aromatización de andrógenos (Albrecht et al., 2001; Daels et al., 1998). En yeguas gestantes, tanto la administración exógena de eCG como la producción de eCG endógena resultan en un incremento en la secreción de estrógenos totales (Daels et al., 1998). Sin embargo la actividad de la enzima aromatasa, que convierte andrógenos en estrógenos, no es estimulada por la eCG, lo que sugiere que el paso limitante en la síntesis lútea de estrógenos no es la actividad de la aromatasa sino la disponibilidad de andrógenos (Albrecht et al., 2001).

En un estudio reciente realizado en gestaciones mulares, en las que existe una deficiencia natural de eCG, se evaluó la correlación entre la secreción de dicha hormona y la de hormonas esteroides, sin encontrarse relación alguna (Urías, 2008), lo que sugiere que no necesariamente un aumento en las concentraciones de andrógenos resulta en una mayor concentración de estrógenos.

Los antagonistas de GnRH han sido usados en varias especies para investigar el papel de la FSH y la LH en el control del desarrollo folicular y el establecimiento del cuerpo lúteo (Evans et al., 2002; Watson et al., 2000; Guillaume et al., 2002; Briant et al., 2003). Los tratamientos con antagonistas de GnRH suprimen el desarrollo folicular por inhibición de la secreción de FSH y LH a nivel hipofisiario en primates y humanos (Fluker et al., 1991; Hall et al., 1991; Fraser et al., 1999).

En estudios realizados en yeguas vacías se ha observado que la aplicación de un antagonista de GnRH induce un retraso en el crecimiento folicular y retrasa la ovulación hasta por 13 días, lo que confirma que en yeguas vacías existe la necesidad de contar con LH para mantener el desarrollo folicular antral desde antes del estado preovulatorio (Guillaume et al. 2002).

El hecho de que en la yegua gestante se produzcan ovulaciones suplementarias a partir del día 35 de la gestación, sugiere que la eCG, es la hormona encargada de la maduración final y ovulación de los folículos dominantes. Dicha hormona no requiere ser estimulada por la GnRH para ser secretada, por lo que con el uso de antagonistas de GnRH en yeguas gestantes se podría lograr que el animal no secrete LH pero sí eCG. Por otra parte, si se utiliza el modelo de gestaciones mulares con dicho tratamiento se pueden obtener animales deficientes tanto en LH como en eCG. El uso simultáneo de yeguas gestantes con embrión equino y con embrión mula a las que se les aplique un antagonista de GnRH permitirá evaluar la importancia relativa de la LH y la eCG durante la maduración y/o ovulación de folículos durante la gestación equina.

2. HIPÓTESIS

Las gestaciones equinas tratadas con un antagonista de GnRH mantendrán el desarrollo folicular gracias a la acción de la eCG; en cambio las gestaciones mulares tratadas de la misma manera interrumpirán su desarrollo folicular, debido a la ausencia simultánea de gonadotropinas hipofisiarias y eCG.

3. OBJETIVOS

1. Evaluar el desarrollo folicular, durante y después de la aplicación de un antagonista de GnRH en gestaciones equinas y mulares.
2. Evaluar las concentraciones de estradiol en ambos tipos de gestación.
3. Evaluar las concentraciones de eCG en ambos tipos de gestación.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

En 1971 se identificó y caracterizó la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (pyro-Glu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-Gly6-Leu7-Arg8-Pro9-Glyamide 10), que es sintetizada y almacenada por neuronas del hipotálamo medio basal. En respuesta a diversas señales, las neuronas productoras de GnRH secretan la neuro-hormona en forma sincronizada, liberando pulsos de GnRH en la eminencia media, donde la hormona ingresa a los capilares del sistema porta-hipotalámico-hipofisiario, que la conducen a la hipófisis anterior, donde estimula la liberación de las gonadotropinas hipofisiarias, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) (Conn et al., 1999).

Bajo el control de GnRH, las gonadotropinas hipofisiarias son liberadas a la circulación para regular la esteroidogénesis gonadal y la maduración de los gametos. La LH regula la ovulación y formación del CL en la hembra, mientras que en el macho estimula la secreción de andrógenos. Por su parte la FSH estimula el crecimiento y maduración de los folículos ováricos en la hembra y la espermatogénesis en el macho. La habilidad del GnRH para estimular las funciones reproductivas cuando se administra en dosis bajas y en forma de pulsos, o para suprimirlas cuando se administra en dosis altas que causan desensibilización, ha sido aplicada con varios propósitos que incluyen la inducción de la ovulación, la estimulación de la espermatogénesis, la anticoncepción, la supresión de la actividad ovárica y de la conducta sexual y el tratamiento de diversos padecimientos (Conn et al., 1999).

4.2 Antagonistas de GnRH

Se han producido una gran cantidad de análogos sintéticos de GnRH (agonistas y antagonistas) debido a su potencial utilidad clínica en el tratamiento de enfermedades neoplásicas y no neoplásicas dependientes de hormonas, en métodos de anticoncepción y en técnicas de reproducción asistida (TRA), particularmente la fertilización *in vitro* en

humanos (Al-Inany et al., 2011). Estos análogos se generan a partir de sustituciones de aminoácidos de la estructura nativa del GnRH.

Los agonistas de GnRH se unen a los receptores de GnRH y los activan, por lo que tienen efectos similares a los de la hormona natural. Sin embargo, si se utilizan en dosis elevadas, terminan por desensibilizar a la hipófisis, por lo que terminan actuando como antagonistas. La desensibilización no se debe a la utilización de análogos sintéticos, ya que puede lograrse también con la administración continua de GnRH natural (Conn y Crowley, 1994). De esta forma, cualquier agonista de la GnRH puede utilizarse como anti-GnRH si se administra en dosis altas y/o en forma continua. Sin embargo, antes de producirse la desensibilización el análogo alcanza a estimular la secreción de gonadotropinas, por lo que inicialmente se obtiene un efecto estimulador opuesto al buscado.

En cambio, los antagonistas puros del GnRH son moléculas capaces de unirse con alta afinidad a los receptores de GnRH pero no los activan, por lo que se comportan como inhibidores competitivos por la unión a sus receptores, lo que resulta en una inmediata supresión de la secreción de gonadotropinas y esteroides sexuales (Chabbert-Buffet et al., 2004). En pocas palabras, los antagonistas de GnRH tienen un mecanismo de acción específico que incluye la inactivación de los receptores para GnRH, lo que lleva a una rápida disminución a corto plazo en los niveles de gonadotropinas, y más específicamente en una rápida disminución en la bioactividad e inmunoreactividad de LH en la circulación. En cambio, la reducción en los niveles de FSH solamente se logra después de varias inyecciones del antagonista (Matikainen et al., 1992).

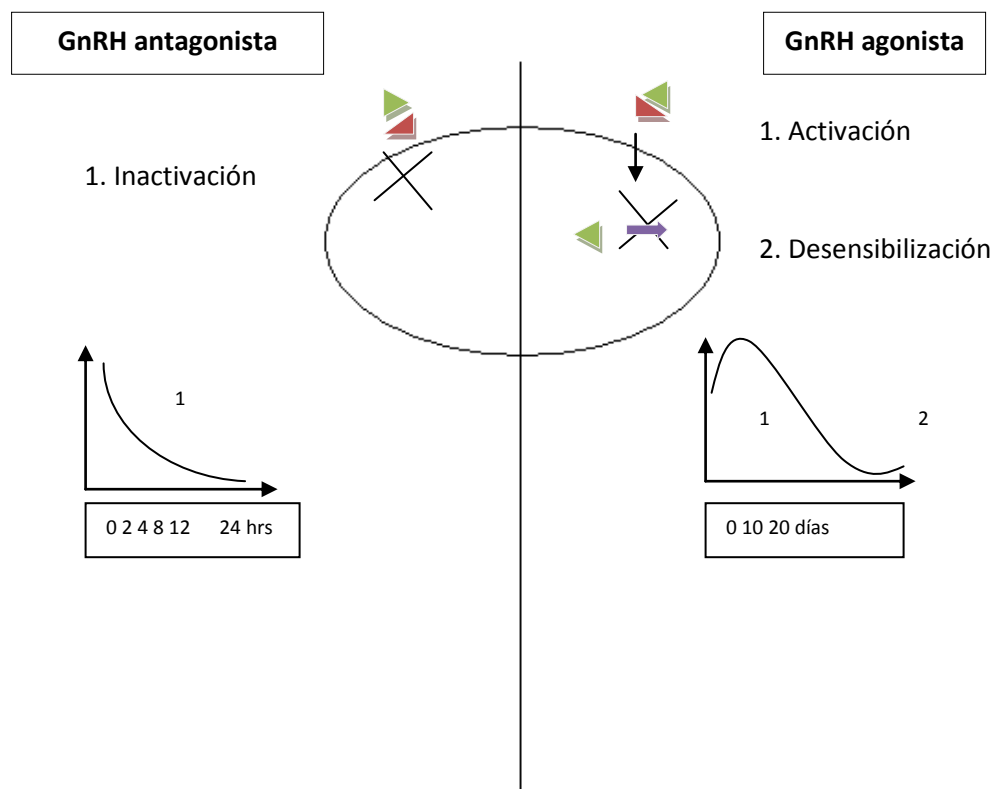


Figura 1. Mecanismos de acción de análogos de GnRH, antagonistas vs agonistas. Adaptada de Chabbert-Buffet et al., 2004.

Los antagonistas ejercen su acción en dosis de miligramos, mientras los agonistas lo hacen en dosis de microgramos. Esta diferencia probablemente se debe a que los inhibidores competitivos necesitan ocupar todos los receptores de GnRH de manera continua para evitar la acción del GnRH endógeno. La farmacocinética de los antagonistas aún permanece en misterio, ya que su vida media en plasma varía desde pocas horas hasta 30 horas. Esta variabilidad pueden deberse a la formación de gel en el sitio de inyección. La formación de gel es influida por las concentraciones de NaCl. Esta propiedad de depósito intrínseco de los antagonistas ha sido usada para manufacturar presentaciones de acción prolongada (Chabbert-Buffet et al., 2004).

Los receptores para GnRH se encuentran en las células productoras de LH y FSH en la hipófisis (gonadotropos). Cuando se administra un antagonista la supresión de la secreción de hormonas gonadotrópicas se inicia casi de inmediato y dura de 10 a 100 horas, dependiendo de la dosis administrada, porque los antagonistas tienen la propiedad intrínseca de incrementar su vida media conforme aumenta la dosis administrada (Lahlou et al., 1990). Además, los antagonistas de GnRH tienen de 100 a 200 veces mayor afinidad de enlace para los receptores de GnRH que la molécula nativa (Reissmann et al., 1995).

Los diferentes antagonistas son producidos por sustitución de 4 a 6 aminoácidos naturales por aminoácidos D no naturales. Desde 1972, cuando el primer antagonista fue sintetizado por remoción de su aminoácido His en la posición 2, muchos antagonistas se han producido (Karten y Rivier, 1986). Dentro de los diversos compuestos de antagonistas de GnRH, se incluyen el Iturelix (Antide) (Danforth, 1991), Cetrorelix (Pinsky et al., 1996; Maclellan et al., 1998; Albano et al., 1997), Ganirelix (Reissman et al., 2000; Gillics et al., 2000), Abarelix, Antarelix (Tavarelix), FE 200486, Acilina (Blithe, 2001).

Como ya se mencionó, los tratamientos con antagonistas de GnRH suprimen la liberación de FSH y LH *in vivo* y han sido usados para estudiar las relaciones hipófisis-ovario en varias especies. En algunas de ellas se han usado para sincronizar el pico de LH y la ovulación, así como para estudiar los requerimientos del soporte gonadotrópico para el crecimiento folicular terminal y la esteroidogénesis (Karnitis et al., 1994) ó para suprimir la actividad ovárica y sincronizar la ovulación (Palmer y Quellier, 1988).

Durante la fase lútea de la yegua, se ha demostrado una relación muy estrecha entre la liberación de GnRH hipotalámica y la secreción de LH y FSH hipofisiarias (Irvine y Alexander, 1993). La secreción de LH se reduce en un 90 a 100% en yeguas ovariectomizadas inmunizadas activamente contra GnRH, mostrando que la liberación de la LH es altamente dependiente de la liberación por GnRH. Por el contrario la FSH sólo se reduce al 50% en yeguas inmunizadas contra GnRH, lo que sugiere que la secreción de FSH es controlada sólo en parte por GnRH (Garza et al., 1998).

Varios experimentos realizados en la yegua demuestran que los antagonistas de GnRH pueden bloquear la secreción de LH y retrasar la ovulación, así como sincronizarla por un periodo variable de días, dependiendo del tipo de antagonista, el tiempo de aplicación, así como la dosis utilizada (Palmer, 1988; Watson et al., 2000; Guillaume et al., 2002; Briant et al., 2003).

El Antarelix (Ac-DNal-DCpa-DPal-Ser-Tyr-DHci-Leu-ILys-Pro-Dala-NH₂) es un antagonista soluble en agua (Deghenghi, et al., 1993) que ha sido probado en algunas especies domésticas, como cerdas (Brüssow et al., 2001), ovejas (Oussaid et al., 1999), vacas (Oussaid et al., 2000) y yeguas (Watson et al., 2000; Guillaume et al., 2002; Briant et al., 2003). Estudios en mujeres y en primates indican que el tratamiento con éste antagonista suprime el desarrollo folicular por inhibición tanto de FSH como de LH a nivel hipofisiario, lo que se asocia con una caída en la producción de estradiol. (Ditkoff et al., 1991; Fluker et al., 1991; Hall et al., 1991; Karnitis et al., 1994; Nelson et al., 1995; Fraser et al., 1999;). Estos estudios coinciden con otros más recientes que demuestran que la aplicación de Antarelix en monos tití suprime los niveles de estradiol 17- β e inhibe la liberación de gonadotropinas (siendo la FSH inhibida en menor grado) cuando se administra a dosis de 12 mg/kg, por vía subcutánea, durante 5 días (día 0-5) ó 10 días (día 0-10) posterior a la aplicación de PGF2 α (día 0; 1 μ g PGF2 α , IM). Además, el tratamiento con el anti -GnRH aplicado por 10 días suprimió el desarrollo de folículos dominantes, mientras que el grupo que recibió el tratamiento por 5 días desarrolló folículos con características preovulatorias pero que no llegaron a ovular y posteriormente sufrieron atresia. Así mismo, se encontró que la vascularización y la angiogénesis foliculares no se vieron afectadas por tratamientos con antagonistas de GnRH, planteando la posibilidad de que quizás otros factores parácrinos regulen la angiogénesis en los folículos ováricos de primates (Taylor et al., 2004).

En la yegua éste antagonista inyectado (0.1mg/kg, SC) en el día 8 del diestro, elimina los pulsos de LH y retrasa la ovulación por 9 días aproximadamente, confirmando el papel de las gonadotropinas en el desarrollo del folículo preovulatorio (Watson et al., 2000).

Al comparar los efectos de Antarelix y Cetorelix sobre la ovulación en la yegua, se encontró que Antarelix (0.01mg/kg, IV, dos veces al día/8 días) administrado en la fase folicular, parece ser más eficiente que Cetorelix (misma dosis) en posponer la ovulación en las yeguas (5 de 5) hasta por 12 días. Durante el tratamiento en el grupo Centrorelis los valores de LH disminuyeron en menor grado que en el grupo Antarelix, además 3 de 5 yeguas del grupo Cetorelix no respondieron al tratamiento y ovularon durante el mismo, y otras dos iniciaron su pico de LH también durante el tratamiento (Guillaume et al., 2002).

Sin embargo en un estudio para determinar si la administración de Antarelix por 3 días (0.01mg/kg) durante el periodo preovulatorio podría posponer la ovulación y si la administración de hCG junto con Antarelix podría inducir ovulación, se encontró que la mitad de las yeguas tratadas con Antarelix respondieron al tratamiento, ovulando 13 días después de terminar el tratamiento, mientras que todas las yeguas tratadas con hCG ovularon al mismo tiempo que las yeguas control. Estos resultados demostraron que el Antarelix es capaz de bloquear la ovulación cuando se aplica justo antes del pico preovulatorio de LH, pero que una pequeña elevación de LH endógena (como probablemente ocurrió en la mitad de las yeguas tratadas con antarelix) o exógena (imitada por hCG) puede inducir la ovulación (Briant et al., 2003).

Más recientemente se ha encontrado que el uso de otro antagonista en la yegua (Acilina) aplicado intramuscularmente (3mg/yegua) durante la fase folicular en el día 10 post-ovulación, suprime las concentraciones de FSH. Sin embargo ésta disminución no impide que una nueva oleada folicular aparezca, indicando que el desarrollo temprano de la oleada es independiente de FSH. Cuando Acilina se administra en el día 15 post-ovulación resulta en una inmediata disminución de las concentraciones de FSH y un retardo en el crecimiento folicular, indicando que los folículos son para éste momento dependientes de FSH (Checura et al., 2009).

4.3 Foliculogénesis

El folículo constituye la unidad estructural y funcional del ovario. Los folículos se clasifican de acuerdo a las características histológicas de las células de la granulosa que rodean al ovocito y al grado de maduración del mismo, en primordiales, primarios, secundarios y terciarios (Gigli et al., 2006). La foliculogénesis es el proceso de formación, crecimiento y diferenciación folicular; abarca desde el estadio de folículo primordial hasta el folículo preovulatorio. La yegua presenta foliculogénesis estacional y se caracteriza por ser la única especie que puede presentar ovulaciones en diestro (Ginther, 1992).

La foliculogénesis en los mamíferos está controlada endócrinamente por las gonadotropinas hipofisiarias (FSH y LH) que actúan en receptores específicos de las células ováricas (Combarnous, 1992; Adashi, 1994; Hillier, 1994). En respuesta a ellas las células foliculares sintetizan y secretan esteroides que actúan como factores endócrinos, parácrinos y autócrinos para regular los niveles de gonadotropinas, la actividad ovárica y la foliculogénesis (Gore-Langton et al., 1994; Gougeon, 1996).

La actividad ovárica es controlada por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Las células neurosecretoras del hipotálamo que producen GnRH proyectan sus axones al espacio perivascular de la eminencia media, y liberan episódicamente GnRH hacia el sistema porta hipotálamo-hipofisiario, el cual transporta la hormona hacia la adenohipófisis, donde los gonadotropos secretan FSH y LH (Alexander, 1993). Dichas gonadotropinas viajan por el torrente sanguíneo hasta llegar a su órgano blanco que es el ovario, en donde la FSH se encarga de reclutar folículos, mientras que la LH estimula su maduración y los hace ovular (Blanchard et al., 2003).

La actividad folicular en yeguas es suprimida durante los meses en que los días son de corta duración. Conforme la longitud de los días aumenta, el número y diámetro de los folículos se incrementa durante 2 ó 3 meses hasta que ocurre la ovulación (Ginther, 1990). El desarrollo folicular no solamente incluye crecimiento y ovulación de los folículos, sino que también puede terminar en el desarrollo de FAH's (Folículos Hemorrágicos Anovulatorios) o en la regresión de folículos y ocurre como ondas u oleadas foliculares durante el ciclo estral, gestación, y temporadas de transición entre las épocas ovulatoria y anovulatoria.

4.3.1 Tipos de oleadas foliculares

Una oleada folicular es definida como la activación y crecimiento simultáneo de un grupo de folículos terciarios que en un punto divergen, continuando uno de ellos su crecimiento y diferenciación (folículo dominante) mientras que los restantes (folículos subordinados) se atresian (Gigli et al., 2006). Las oleadas foliculares se han clasificado como mayores y menores, dependiendo de si ellas involucran el desarrollo de un folículo dominante (mayor a 30 mm de diámetro) ó, si sólo producen folículos pequeños (menores a 30 mm de diámetro) (Ginther, 1993; Donadeu y Ginther 2002).

La oleada mayor primaria siempre emerge durante la mitad del diestro y produce folículos ovulatorios. Aproximadamente el 25% de los intervalos interovulatorios involucran una oleada mayor adicional (oleada secundaria) que se desarrolla durante la primera mitad del ciclo estral (Sirois et al., 1989; Bergfelt y Ginther 1993).

La incidencia de oleadas secundarias es significativamente mayor en algunas razas, como Pura Sangre Inglés y algunas de éstas oleadas producen ovulaciones. La habilidad para ovular con altas concentraciones de progesterona durante el diestro es una característica única de la especie equina (Ginther, 1992).

Las oleadas menores, que solamente resultan en el desarrollo de folículos menores a 30 mm, pueden ocurrir en diferentes estados del ciclo estral, con una incidencia menor al 25 % (Bergfelt y Ginther, 1993; Ginther, 1993).

4.3.2 Papel de hormonas y factores del crecimiento en la foliculogénesis

4.3.2.1 Hormona folículo estimulante (FSH)

Se sabe que la liberación de FSH no está controlada del todo por la GnRH, ya que en estudios en los que se ha abolido la actividad endógena de GnRH se ha comprobado que algunos de los pulsos de FSH preceden el inicio de la liberación de pulsos de GnRH (Culler y Negro-Villar, 1987).

La secreción de FSH es regulada por varias sustancias, que incluyen a los esteroides gonadales y a varias proteínas reguladoras de FSH, tales como activinas, inhibinas y folistatinas. Diversos estudios han sugerido que estas proteínas son producidas no solo en el ovario sino también en la hipófisis y por lo tanto tienen potencial para ejercer efectos modulatorios sobre la secreción de FSH. Aunque existen evidencias neuroanatómicas, bioquímicas y fisiológicas para apoyar la existencia de un factor liberador de FSH, éste factor no ha sido aislado ni purificado (Padmanabhan y McNeilly, 2001).

La FSH es necesaria para el reclutamiento de folículos antrales. La unión de la FSH con sus receptores en las células de la granulosa estimula la transcripción y activación de la enzima aromatasa ayudando así a la transformación de los andrógenos en estradiol (Van, 1999). La FSH también está involucrada en el aumento de la vascularización del folículo dominante, con lo que se permite una mayor obtención de nutrientes. Bajo la influencia de la FSH, las células de la granulosa se dividen por mitosis incrementando las capas que rodean al ovocito primario y aumentando el tamaño folicular. La FSH junto con el estradiol estimulan la formación de la cavidad antral y la expresión de receptores para LH en las células de la granulosa del folículo preovulatorio. Durante la ovulación la FSH estimula la secreción del activador del plasminógeno por parte de las células de la granulosa (Alexander e Irvine, 1993; Gigli et al., 2006).

En yeguas gestantes las concentraciones de FSH generalmente comienzan a incrementarse 4 días antes de que se pueda identificar una oleada y disminuyen entre el tercer y cuarto día de la oleada, momento en el cual existe una divergencia folicular. En hembras con folículos grandes y sólo una oleada mayor, las concentraciones de FSH son más bajas, lo cual probablemente se debe a que la presencia del folículo dominante inhibe la secreción de FSH. (Ginther y Bergfelt, 1992).

4.3.2.2 Hormona luteinizante (LH)

La LH ejerce su acción uniéndose a receptores de membrana en las células de la teca interna de folículos en diversos grados de desarrollo, así como en las células de la granulosa de folículos dominantes y folículos preovulatorios. Produce un aumento de las concentraciones de AMPc vía adenil ciclasa, estimulando la conversión de colesterol en pregnenolona para estimular la síntesis de andrógenos en las células de la teca interna. En comparación con la LH de otras especies, la LH equina es la que más carbohidratos contiene (sulfatos y ácido siálico), por lo que al medir la hormona en la circulación es muy difícil detectarla debido a que su liberación es cada 2 a 4 hrs (Bousfield et al., 2004). La concentración de la LH es baja en la mitad de la fase lútea y comienza a aumentar pocos días antes del estro. Al alcanzar niveles preovulatorios induce el reinicio de la meiosis en el ovocito del folículo preovulatorio e induce la dehiscencia folicular, alcanzando generalmente su mayor concentración en plasma un día después de producida la ovulación, cuando apoya el desarrollo y mantenimiento del cuerpo lúteo (Gigli et al., 2006).

4.3.2.3 Factor de crecimiento parecido a la Insulina (IGF) y Factor de crecimiento transformante (TGF)

Los factores de crecimiento parecidos a la insulina son producidos por células de la teca y de la granulosa. En el ovario hay IGF-1 y 2. La actividad biológica de estas hormonas está regulada por las proteínas de unión (IGFBP's). Estas proteínas modulan la acción de los IGF al impedir la unión a sus receptores, ya que únicamente el IGF libre tiene acción biológica, que consiste en amplificar la respuesta a la FSH, con lo que estimula la proliferación de las células de la granulosa, la síntesis de hormonas esteroideas y también la producción de inhibinas y activinas. La acción de los IGF está regulada por la PAPP-A (proteína plasmática asociada a la preñez), la cual incrementa la biodisponibilidad de IGF-1 en los folículos al degradar a las proteínas de unión (Gigli et al., 2006). Las concentraciones de IGF-1 aumentan en el futuro folículo dominante antes de iniciarse la desviación concomitante con el incremento de estradiol.

Los factores transformantes de crecimiento (TGF) traslocan proteínas desde el citoplasma al núcleo celular, algunos son: TGF β , GDF-9 (factor de crecimiento y diferenciación tipo 9), AMH (hormona antimulleriana) activinas, inhibinas y la proteína morfogénica ósea (BMP). En el ovario se han descrito BMP-15 y BMP-6 (Glister et al., 2004).

4.3.2.4 Inhibinas y activinas

Tanto la inhibina como la activina son producidas por células de la granulosa del folículo dominante. Están formadas por la dimerización de subunidades. La unión de la subunidad α con la βA forman a la Inhibina A y la α con la βB forman a la Inhibina B. La unión de la subunidad $\beta A + \beta A$ ó $\beta B + \beta B$ formarán Activina A ó B. Tanto Inhibina como Activina actúan en forma parácrina, respectivamente inhibiendo o estimulando el crecimiento de folículos subordinados. La activina es una proteína dimérica que induce la proliferación y expresión de los receptores para FSH en las células de la granulosa y aumenta la esteroidogénesis y actividad de la aromatasa en ratas y vacas (Ginther et al., 2004a). Adicionalmente la inhibina actúa en forma sistémica inhibiendo la secreción hipofisiaria de FSH. La secreción de inhibina es estimulada por la FSH, formando un circuito de regulación negativa (Glister et al., 2001).

4.3.2.5 Estrógenos

Su secreción sigue el modelo de “dos células-dos gonadotropinas”. La primera señal para iniciar la síntesis de hormonas esteroides en las células esteroidogénicas del ovario es la unión de LH a su receptor específico en las células de la teca interna, donde se producen grandes cantidades de andrógenos (androstenediona y testosterona), los cuales se difunden a las células de la granulosa, en las que la unión de FSH a su receptor estimulan la aromatización de los andrógenos a estrógenos (Midnich et al., 2004; Sanderson, 2006).

Existe otra teoría que dice que el papel de las células de la granulosa es la de producir progesterona (Díaz Chico, 2004), la cual es captada por las células de la teca y es transformada a andrógenos, que vuelven a la célula de la granulosa donde son aromatizados por la enzima aromatasa y son convertidos a estradiol (Sirois et al., 1991; Schams y Berisha, 2002).

Cuando el futuro folículo dominante está empezando a desviarse, se desarrollan diversas interacciones bioquímicas. Las proteínas de unión son degradadas por proteasas y entonces el IGF-1 es liberado y puede estimular la producción de inhibina A, activina A y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), pero no tiene un efecto inmediato sobre la secreción de estradiol en la yegua (Ginther et al., 2004b).

Las concentraciones de estradiol son bajas durante la época anovulatoria (Donadeu y Ginther, 2002) existiendo niveles detectables hasta el final de la temporada, durante el desarrollo de la primera oleada ovulatoria (Watson et al., 2002), aumentando hasta 2 días después del pico de FSH, o alrededor de un día antes de la desviación (Ginther et al., 2004a).

4.3.3 Foliculogénesis Inicial

Durante la vida fetal temprana, las células germinales primordiales migran a la cresta gonadal primitiva donde proliferan. En el equino la multiplicación de las ovogonias por mitosis comienza alrededor del día 50 de gestación y continúa hasta el día 150 a 160 (Deanesly, 1977). Las ovogonias, posteriormente son rodeadas por células somáticas para formar folículos primordiales. También durante la vida fetal, las células germinales inician la primera división meiótica, que queda suspendida en la profase. En esta etapa la célula germinal se denomina ovocito primario. El folículo primordial con su ovocito primario permanece en esta fase hasta el momento en que es activado para iniciar su crecimiento. Esta activación es independiente de gonadotropinas y puede iniciarse en cualquier etapa desde la vida fetal hasta la vida adulta, desconociéndose los mecanismos que determinan cuál folículo primordial es activado para iniciar su desarrollo en un momento determinado (Van, 1999).

Los primeros signos morfológicos de crecimiento folicular (activación) son la proliferación de células de la granulosa, que cambian de una forma plana a cúbica, así como el crecimiento del ovocito (Hirshfield, 1991). El inicio del crecimiento es independiente de gonadotropinas y está regulado por factores producidos localmente tanto dentro del ovario como dentro del folículo mismo (Nilsson y Skinner, 2002). Entre estos se encuentran factores del crecimiento como el factor de crecimiento y diferenciación 9 (Growth Differentiating factor-9, GDF-9) y la proteína morfogénica ósea (Bone Morphogenic Protein, BMP) que son producidos únicamente por el ovocito y cuya carencia detiene el crecimiento del folículo en estadio primario (Webb et al., 2003).

Una vez que el crecimiento se ha iniciado, los folículos continúan desarrollándose por estímulo de factores de crecimiento, tales como IGF-1, EGF, TGF α , Inhibina, Activina A y B y Folistatina. Aunque los receptores para FSH se expresan en células de la granulosa desde las primeras etapas foliculares, se ha visto que en ovejas hipofisectomizadas los folículos alcanzan un tamaño de hasta 2mm de diámetro, por lo cual se consideran independientes de gonadotropinas. Así, en la foliculogénesis inicial los folículos se consideran independientes pero sensibles a las gonadotropinas (Driancourt et al., 1987).

Las células pregranulosas, derivadas del epitelio ovárico, se diferencian en células de la granulosa que rodean a los ovocitos primarios, para formar los folículos primordiales, que histológicamente se caracterizan por contener un ovocito primario en profase de su primera división meiótica (diploteno), rodeado por una capa plana de células de la granulosa. Estos folículos primordiales todavía carecen de una membrana basal que los separe del resto del tejido ovárico. A partir de esta población se origina toda la población de folículos en crecimiento. Una potranca recién nacida tiene en sus ovarios entre 36,000 y 46,000 folículos primordiales (Ginther, 1992).

Posteriormente algunos de estos folículos salen de este estado de reposo y comienzan a desarrollarse bajo la regulación de diversos factores de crecimiento, para formar folículos primarios, en los que las células planas de la granulosa comienzan a cambiar de una forma plana a cúbica, quedando el ovocito primario rodeado por la zona pelúcida y una capa de células cúbicas de la granulosa. Las células de la teca comienzan a rodear por fuera a las células de la granulosa. Cuando las células de la granulosa aumentan en

tamaño y número, multiplicándose por mitosis bajo la influencia de FSH, dan origen a varias capas de células cúbicas y se le denomina folículo secundario (Van, 1999).

En esta etapa las células de la teca se diferencian en teca interna y externa y comienzan a secretar glicoproteínas para formar una membrana basal que separa a las células de la granulosa de las de la teca interna. Hasta este estadio, los folículos en crecimiento se clasifican en preantrales, que son los que aún no tienen una cavidad llena de fluido y en los folículos terciarios o antrales, que histológicamente tienen una cavidad o antro. Este último que es un espacio lleno de líquido folicular, que al acumularse produce un reordenamiento de las células del cúmulo y murales. La FSH, junto con el E2, estimula la formación de la cavidad antral y la expresión de receptores para LH en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios (Alexander e Irvine, 1993).

El líquido con el que se llena el antro folicular es un trasudado que en el equino comienza a ser visible en el equino en folículos de 2 a 4 mm (Ginther, 1992). Hasta ese momento las capas exteriores del folículo están formadas por una teca interna constituida por tejido conectivo y una teca externa formada por una capa de colágeno atravesada por capilares con miofibroblastos diferenciados de los fibroblastos del estroma.

4.3.4 Foliculogénesis dependiente de gonadotropinas

En el folículo antral temprano las células de la granulosa expresan receptores para FSH mientras que las de la teca interna expresan receptores para LH. Para éste momento el folículo se hace totalmente dependiente de gonadotropinas. Los folículos terciarios se clasifican en dominantes y subordinados, los primeros expresan un mayor número de receptores para LH en las células de la granulosa, además de los receptores para FSH (Fay y Douglas, 1987; Goudet et al., 1999; Beg et al., 2001).

Conforme avanza el desarrollo folicular, los folículos se vuelven altamente sensibles a las gonadotropinas. Esta fase se divide en tres etapas: 1) reclutamiento, en la que un

grupo de folículos adquiere la habilidad para responder a las gonadotropinas y empieza a crecer rápidamente; 2) selección, en la que un grupo de folículos es escogido para escapar del proceso de atresia y continuar creciendo, y 3) dominancia, en la que uno ó dos folículos se desarrollan de forma más rápida que el resto, suprimiendo el crecimiento de los subordinados e impidiendo el reclutamiento de un nuevo grupo de estructuras foliculares (Armstrong y Webb, 1997).

4.3.4.1 Reclutamiento folicular

Durante cada oleada folicular se produce el crecimiento acelerado de una cohorte de folículos que son reclutados simultáneamente mediante una elevación transitoria en las concentraciones de FSH. Los niveles de FSH dependen de inhibina y de estrógenos, los cuales autoregulan el desarrollo de los folículos. La inhibina y el estradiol son producidos por todos los folículos en crecimiento, pero principalmente por los folículos dominantes. Por esta razón se producen elevaciones de FSH cada vez que los folículos dominantes son ovulados o sufren atresia, ya que en esos momentos desaparece la fuente principal de inhibina y estradiol. Los folículos que son reclutados son los que tienen entre 6 ó 13 mm de diámetro (Ginther et al., 2001) al momento de la elevación de FSH. La dependencia de las oleadas por la FSH ha sido demostrada mediante la inyección sistémica de líquido folicular libre de esteroides, el cual suprime la FSH circulante, lo que impide que los folículos crezcan más allá de 15 mm de diámetro (Bergfelt y Ginther 1985). La primera oleada de cada ciclo comienza un poco después de la ovulación, e involucra el crecimiento simultáneo de un número variable de 5 a 10 folículos, que crecen entre 2 y 3 mm por día, hasta que el folículo más grande alcanza 20 a 25 mm cerca del final de la fase de crecimiento común (Ginther et al., 2003; Donadeu y Pedersen, 2008).

4.3.4.2 Selección folicular

En esta etapa participan una variedad de proteínas y esteroides, incluyendo los miembros de la familia de factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF), estradiol (E2), inhibinas, activinas, folistatina y el VEGF. Estos factores actúan a menudo de manera parácrina, ya sea para aumentando ó disminuyendo los efectos trópicos de las gonadotropinas en las células foliculares a través de varios mecanismos. Sin embargo, se ha concluido que solo el IGF-1 está involucrado en el inicio de la desviación regulando los niveles de otros factores del crecimiento en el folículo dominante (Beg y Ginther, 2006). En el folículo equino se han identificado cuatro tipos de proteínas de unión de IGF (IGFBP's), las cuales regulan negativamente la actividad de IGF. Sólo la concentración de tres de ellas (IGFBP-2, 4 y 5) se ha correlacionado negativamente con las del IGF-1 durante el desarrollo folicular (Gerard y Monget, 1998; Bridges et al., 2002) y de éstas, la IGFBP-2 es la única que se ha estudiado en relación a la desviación en la yegua (Ginther et al., 2004b).

De esta manera, conforme los folículos continúan creciendo las concentraciones de estradiol, inhibina A, activina A e IGF-1 se incrementan y los folículos más avanzados en su desarrollo comienzan a expresar más receptores para LH y pocos para FSH (Fay y Douglas, 1987; Goudet et al., 1999). En este momento se establece una especie de competencia entre los folículos, ya que los tres folículos más grandes de la oleada, conforme crecen por encima de los 13 mm de diámetro (Donadeu y Ginther, 2001) producen suficiente inhibina A y estradiol para inhibir las concentraciones de FSH, la cual aún es necesaria para que los folículos menos desarrollados continúen creciendo. En cambio, los folículos mayores ya tienen suficientes receptores para LH, por lo que pueden seguir creciendo. Estas respuestas diferenciadas del folículo dominante y los subordinados a las gonadotropinas resultan en el iniciacio de la desviación, que es cuando uno o dos folículos crecen notoriamente más rápido que el resto de los folículos. La desviación comienza en promedio 7 días antes de la ovulación. El continuo crecimiento del folículo más grande lo transforma en el folículo dominante, cuyo diámetro aumenta en diámetro hasta que ovula o hasta que se convierte en un folículo anovulatorio hemorrágico ó simplemente sufre regresión, lo cual depende en gran parte de la estación y estado reproductivo de la hembra. Mientras la reducción de crecimiento

del resto de los folículos los convierte en folículos subordinados (Donadeu y Pedersen, 2008).

Mientras la FSH es particularmente importante para el crecimiento folicular antes de la desviación, la LH llega a ser más crítica durante la desviación, ya que la supresión experimental de la secreción de LH en yeguas ciclando llevó a la regresión del folículo dominante durante su desarrollo temprano (Bergfelt et al. 2001).

4.3.4.3 Dominancia folicular

Durante este tiempo el folículo más grande, mediante su secreción de inhibina, estradiol e IGF-1, juega el papel de supresor de las concentraciones de FSH circulantes, las cuales caen por debajo de los requerimientos de los folículos más pequeños, provocando su atresia. En cambio, como ya se mencionó, el folículo dominante puede continuar creciendo en un ambiente bajo en FSH debido a que ha desarrollado receptores para LH, por lo que deja de ser dependiente de la FSH (Ginther, 2000).

El folículo dominante en este momento produce altos niveles de estradiol (Gastal et al., 1999) con valores que van de los 18 a los 20 pg/ml⁻¹ en promedio (Daels et al., 1991b). La mayor concentración de E2 en el folículo dominante se debe a un mecanismo intrafolicular que amplifica el estímulo de FSH mediante un efecto sinérgico de IGF-1 (Rivera y Fortune, 2003), lo que aumenta la actividad de la aromatasa en el folículo. En cambio, la producción de andrógenos es similar en folículos dominantes y subordinados. Adicionalmente tanto el estradiol como el TGF- β interactúan con la FSH para aumentar el número de células de la granulosa y acrecentar la actividad de la aromatasa.

El VEGF es un factor que incrementa la vascularización del futuro folículo dominante antes del inicio de la desviación (Acosta et al. 2004), lo que presumiblemente incrementa la disponibilidad de gonadotropinas circulantes para el folículo. Se ha observado que las concentraciones de VEGF son más altas en el folículo dominante que en los subordinados un día después del inicio de la desviación (Ginther et al., 2004b). Los

niveles de VEGF que se incrementan diferencialmente en el folículo dominante en la yegua (Ginther et al, 2004b) quizás sean mediados por IGF-1.

Después de varios días de desarrollo, el folículo dominante solamente podrá seguir creciendo hasta llegar a ovular sólo si aumenta la frecuencia de los pulsos de LH. Esto ocurre cuando el folículo preovulatorio alcanza alrededor de 40 mm de diámetro. Sin embargo el diámetro máximo de un folículo preovulatorio puede variar con la estación reproductiva (5 a 8 mm más grandes en primavera en comparación con el verano u otoño), tipo de yegua y número de folículos preovulatorios (4 a 9 mm más pequeños en ovulaciones dobles) (Bergfelt, 2009).

Después de la ovulación (día 0), la cual es estimulada por un aumento gradual y progresivo de LH (Pierson, 1993), el ovocito es liberado hacia el oviducto a través de la fosa de ovulación. En el antro evacuado del folículo se forma el cuerpo hemorrágico (CH) y posteriormente el cuerpo lúteo (CL). En la mayoría de los mamíferos no primates, el cuerpo lúteo se forma a partir de células residuales de la teca y de la granulosa, las cuales se transforman en células lúteas pequeñas y grandes respectivamente (Niswender et al., 2000). En el caso de la yegua no se conoce con certeza el destino de las células de la teca, sin embargo existen datos que indican que las células de la teca interna son las mejor desarrolladas pocos días antes de la ovulación, pero sufren atresia rápidamente después de ésta y para las 24 hrs post-ovulación se encuentran en un estado avanzado de degeneración, mientras que las células de la granulosa se diferencian en células lúteas grandes que se convierten en las principales células productoras de esteroides (Van Niekerk et al., 1975).

Aunque las células de la teca interna juegan un papel menor en la síntesis de progesterona y estradiol, es en ellas donde se sintetiza la mayor parte de andrógenos, los cuales serán aromatizados por las células de la granulosa (Sirois et al., 1991).

En caso de no producirse el aumento en la frecuencia de secreción de LH el folículo dominante terminará sufriendo atresia, por lo que al disminuir su producción de inhibina se elevarán las concentraciones de FSH, con lo que comenzará una nueva oleada folicular.

4.4 Desarrollo folicular en la yegua gestante

El CL resultado de la ovulación, se denomina CL primario y se mantiene activo desde el día 5 al 14 si el óvulo no es fertilizado (Gigli et al., 2006). En cambio si el óvulo es fecundado éste CL primario no sufre regresión ya que se presenta el reconocimiento materno de la gestación, que ocurre por una interacción entre el embrión y la yegua (Allen, 2001) que permite que el CL se mantenga hasta el día 160 - 180 de la gestación.

Durante la gestación temprana en plena época reproductiva se mantiene un patrón periódico de secreción de FSH cada 10 a 12 días (Urwin y Allen, 1982) caracterizado por el desarrollo esporádico de oleadas mayores y menores (Ginther y Bergfelt, 1992). Además, la gestación equina temprana se caracteriza por desarrollarse en presencia de bajas concentraciones de LH debido a la retroalimentación negativa ejercida por la progesterona. De esta manera, los folículos dominantes que se desarrollan antes del día 35 bajo la influencia de FSH no llegan a ovular por falta de LH. Sin embargo, a partir del día 35, cuando comienza la secreción de eCG por las copas endometriales, el desarrollo de un folículo dominante provocado por la FSH puede continuar bajo el estímulo de eCG hasta la maduración final, ovulación y/o luteinización del folículo (Allen, 1984; Ginther, 1992).

Los cuerpos lúteos secundarios de la gestación resultan de la ovulación de folículos dominantes durante la gestación temprana, mientras que los cuerpos lúteos accesorios resultan de la luteinización de folículos anovulatorios dominantes durante la gestación temprana.

Ambos tipos de cuerpos lúteos, secundarios y accesorios, son referidos como suplementarios (Ginther, 1992) y tradicionalmente se ha pensado que su formación ocurre gracias a la acción luteotrópica de la eCG entre el día 35 y 80 de la gestación (Bergfelt et al., 1989; Allen y Stewart, 1993). Su regresión ocurre aproximadamente al mismo tiempo que la del cuerpo lúteo primario, entre el día 120 y 150 de la gestación, momento en que la placenta ya es capaz de mantener la gestación hasta su término mediante la secreción de progesterona (Cole et al., 1931; Amoroso, et al., 1948).

Estudios en yeguas gestantes indican que el diámetro de los folículos que se desarrollan durante la gestación alcanza su máximo alrededor del día 60, coincidiendo con la formación del CL secundario. Conforme avanza la gestación tanto el número como el diámetro máximo de los folículos disminuyen, teniendo el diámetro más pequeño entre el día 160 y 180, lo que quizás se deba al incremento en el número de CL secundarios (Squires et al., 1974a).

Estos datos coinciden con los resultados de otro experimento que indican que el número de folículos de 10 a 20 mm de diámetro es mayor en la gestación temprana de la yegua. Para el momento en que se forman los CL secundarios (día 34 a 70 de la gestación) el número de folículos grandes comienza a disminuir y para el día 210, los ovarios están desprovistos de folículos mayores a 20 mm (Squires et al., 1974b). Por lo que se piensa que el número reducido de folículos a la mitad de la gestación, es atribuible a la formación de cuerpos lúteos suplementarios bajo la influencia de la gonadotropina coriónica (Ginther, 1992).

4.5 Endocrinología de la gestación equina temprana

4.5.1 Estrógenos

Los niveles de estrógenos en los días 0 a 35 de la gestación son similares a los de una yegua vacía en diestro (Terqui y Palmer, 1979). Posteriormente las concentraciones plasmáticas de estrógenos se duplican o triplican entre los días 35 y 40. Después de éste incremento las concentraciones de estrógenos tienden a mantenerse estables, desde el día 40 hasta el día 70 u 80 de la gestación. Posteriormente vuelven a incrementarse hasta alcanzar valores mayores a 10 ng/ml para el día 90, permaneciendo elevados por el resto de la gestación (Nett et al., 1975).

El incremento en las concentraciones de estrógenos entre los días 35 a 40 es de origen ovárico y posiblemente esté asociado al efecto estimulante de la eCG sobre la esteroidogénesis folicular o lútea, ya que en yeguas gestantes con ovariectomía y

mantenidas con progestágenos exógenos no se detectan niveles de estrógenos (Terqui y Palmer, 1979).

Estos estrógenos ováricos en la yeguas gestantes, son producidos por tejido lúteo y no folicular, ya que se ha demostrado que el incremento en la secreción de estrógenos en éstos días de la gestación (35 a 40) requiere de la presencia de un CL activo. Esto se demostró al lisar con PGF 2α el CL de yeguas gestantes que fueron mantenidas con progesterona exógena, en las que las concentraciones de estrógenos fueron menores comparadas con las de las yeguas control que tuvieron un CL activo (sin administración de PGF 2α). Además, las yeguas tratadas desarrollaron un nuevo CL y un aumento en los valores de estrógenos conjugados después del inicio de la secreción de la eCG endógena (Daels et al., 1991a). Se ha sugerido que el papel de los estrógenos lúteos es apoyar de manera autócrina la producción de progesterona (Daels et al., 1990).

Se ha demostrado que el incremento en la esteroidogénesis lútea que coincide con la secreción de eCG es inducida por esta misma y resulta en un incremento en la síntesis de estrógenos y andrógenos (Daels et al., 1998).

En estudios en los que se ha comparado la actividad enzimática en el cuerpo lúteo antes y después del inicio de la secreción de eCG se ha demostrado que esta hormona tiene un efecto diferencial sobre la expresión de las enzimas esteroidogénicas, provocando un aumento de la actividad de la 17 α -hidroxilasa y un descenso en la actividad de la aromatasa, por lo que el incremento en la producción de estrógenos inducido por la eCG es el resultado del incremento en las concentraciones de andrógenos disponibles para ser aromatizados (Albrecht et al., 1997).

Sin embargo, en un estudio reciente no se encontró evidencia de un efecto estimulador de la eCG sobre la producción de estradiol en la yegua gestante, ya que no se observó ningún incremento en las concentraciones de estradiol asociado al gran incremento de eCG que se produce entre las semanas 5 y 8 de la gestación. Además, durante las primeras 14 semanas de gestación no hubo diferencia significativa entre las concentraciones de estradiol entre yeguas gestantes con embrión mula y caballo, a pesar de las grandes diferencias en las concentraciones de eCG entre ambos tipos de yegua (Urias, 2008).

Una proporción importante de los estrógenos producidos por el cuerpo lúteo resultan de la aromatización de los andrógenos, sin embargo la actividad de la enzima aromatasa, que convierte andrógenos en estrógenos, no es estimulada por la eCG, lo que sugiere que el paso limitante en la síntesis lútea de estrógenos no es la actividad de la aromatasa, sino la disponibilidad de andrógenos. (Albrecht et al., 2001).

La expresión ovárica de las enzimas esteroidogénicas se relaciona con los niveles de esteroides en el líquido folicular en vacas, cerdos y humanos (Tian et al., 1995; Guthrie et al., 1994; Conley et al., 1994). En el ovario equino las enzimas P450 scc, 3 β HSD y aromatasa son expresadas en las células de la granulosa de todos los folículos con diámetro desde los 5 mm hasta un tamaño preovulatorio, lo que significa que tienen la capacidad tanto de producir progesterona como de aromatizar andrógenos. Su expresión es influenciada por el diámetro folicular y el estado de desarrollo (Belin et al., 2000).

Después del día 90, conforme la gestación avanza, las gónadas fetales comienzan a crecer y a secretar estrógenos, por lo que el estradiol secretado después del día 90 es de origen feto-placentario y no ovárico (Terqui y Palmer, 1979).

4.5.2 Progesterona (P4)

La síntesis de progesterona depende totalmente del transporte de colesterol hacia el interior de la mitocondria (Devoto et al., 2002). El transporte está regulado principalmente por la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR), la cual transporta el colesterol del citoplasma hacia la membrana mitocondrial interna, donde ocurren varias interacciones enzimáticas (Belin et al., 2000). La primera enzima involucrada en la síntesis de esteroides es la P450 scc la cual corta la cadena del colesterol entre sus carbonos 20 y 22 para formar pregnenolona (Belin et al 2000; Boerboom y Sirois, 2001). Posteriormente, la conversión de pregnenolona a progesterona está regulada por la enzima 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa (3 β HSD). Otra enzima, denominada 17 α hidroxilasa (P450c17) convierte la pregnenolona en 17 α hidroxipregnenolona (Belin et al., 2000). Sin embargo en el cuerpo lúteo es más activa la 3 β HSD, por lo que hay mayor producción de progesterona (Díaz Chico, 2004).

Entre 10 y 12 horas después de la ovulación el CL de la yegua ya produce altas cantidades de progesterona (Gigli et al., 2006). El CL primario permanece activo y produciendo progesterona hasta el día 160-180 de la gestación (Squires et al., 1974a), siendo mantenido al parecer gracias al efecto de la LH, que por su alta afinidad lo logra estimular a pesar de sus bajas concentraciones durante la gestación temprana. También es posible que la eCG contribuya a mantener la función lútea a través de su unión a los receptores de LH/eCG en el ovario.

Con la formación de los CL suplementarios se apoya la producción de P4 desde el día 40-45 hasta que la placenta es capaz de mantener la gestación.

En la yegua gestante, las concentraciones de progesterona aumentan inmediatamente después de la ovulación, alcanzando durante la primera semana niveles de 7ng/ml (Squires et al., 1974c), los cuales disminuyen entre el día 12 y el día 30, llegando a valores menores a 5 ng/ml para el día 28. Sin embargo entre los días 32 y 40 las concentraciones de progesterona vuelven a aumentar debido a que se inicia la secreción de eCG, la cual estimula al tejido lúteo para secretar más progesterona (Squires et al., 1974c).

Las máximas concentraciones de P4 se presentan alrededor del día 65 de la gestación, con niveles mayores a los 15ng/ml (Holtan et al., 1975). Después las concentraciones comienzan a bajar debido a la regresión de los cuerpos lúteos entre los días 150 -180, sin embargo a partir del día 120, la placenta ya es capaz de secretar suficiente progesterona para mantener la gestación (Holtan et al., 1979).

4.5.3 Gonadotropina coriónica equina (eCG).

Cole y Hart (1930) fueron los primeros en descubrir las funciones biológicas de la eCG a la cual dieron el nombre de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG, por sus siglas en inglés). Inicialmente se pensaba que esta hormona era de origen materno, sin embargo más tarde se demostró que era una glicoproteína de origen fetal, siendo producida por las células del cinturón coriónico que invaden el endometrio materno para

formar las copas endometriales, por lo que se le llamó gonadotropina coriónica equina (eCG) (Allen y Moor, 1972).

Alrededor del día 27 de la gestación se comienza a formar una banda de tejido avascular alrededor del embrión, denominada cinturón coriónico (Wooding et al., 2001) el cual para el día 30 ya está completamente formado. Las células binucleadas del cinturón coriónico se comienzan a desprender y por movimientos amiboideos se incrustan en el endometrio de la madre, donde proliferan para formar las copas endometriales secretoras de eCG (Thway et al., 2001). Estas estructuras crecen gradualmente para alcanzar su tamaño máximo y su máxima capacidad secretora entre los días 60 y 70 de gestación (Allen, 2000; Meenakshi et al., 2006).

La gonadotropina coriónica equina ha sido purificada en la yegua y burra (Clegg et al., 1982) y puede ser encontrada en híbridos de éstas dos especies. Su secuencia de aminoácidos no es idéntica entre estas especies, por lo que recibe el nombre de acuerdo a la especie que la produce como gonadotropina coriónica equina (eCG) y gonadotropina coriónica de burra (dCG).

4.5.3.1 Estructura de la eCG

La eCG pertenece a la familia de las hormonas glicoprotéicas. Tiene un peso molecular aproximado de entre 64 y 72 KDa (Gospodarowicz, 1967; Christakos y Bahl, 1979). Está formada por dos subunidades, α y β (Legardinier et al., 2005). Los genes que codifican a la subunidad α y β de la eCG son los mismos que codifican a las subunidades de la LH (Smith et al., 1993). Sin embargo, cuando se expresan estos genes en la hipófisis dan como resultado la LH, mientras que en la placenta se forma la eCG debido a que en cada uno de estos tejidos se produce un patrón diferente de glicosilación.

La subunidad α tiene 96 aminoácidos (Ward et al., 1982) y es común para todas las hormonas glicoprotéicas del equino (LH, FSH, TSH, eCG), ya que es codificada por un mismo gen (Pierce y Parsons, 1981). La subunidad β de la LH y la eCG está compuesta por 149 aminoácidos y es codificada por el mismo gen y a diferencia de la subunidad α , tiene una secuencia de aminoácidos distinta que las del resto de las hormonas glicoprotéicas (FSH y TSH), lo que determina su distintiva actividad biológica (Pierce y

Parsons, 1981). Como las secuencias de aminoácidos de LH y eCG son idénticas (Bousfield et al., 1987; Sugino et al., 1987) se unen al mismo receptor, aunque su distinto patrón de glicosilación hace que tengan diferente afinidad por el receptor de LH/eCG.

La eCG es la más glicosilada de las hormonas glicoprotéicas, con aproximadamente un 45% de su masa constituida por carbohidratos. La subunidad α tiene entre un 20 y 22% de su peso molecular constituido por carbohidratos y la subunidad β entre un 50 y 78% (Papkoff et al., 1978b; Christakos y Bahl, 1979). La subunidad α tiene dos sitios de glicosilación, mientras que la subunidad β tiene un sitio N y cuatro sitios O de unión para glicosilación (Papkoff et al., 1978a).

Una de las diferencias más importantes entre la eCG y la LH es que en los carbohidratos de la eCG hay una alta proporción de terminaciones constituidas por ácido siálico (Smith et al., 1993), aunque puede haber variabilidad en la proporción de ácido siálico entre individuos y en las diferentes etapas de la gestación. La eCG extraída directamente de las copas endometriales contiene más ácido siálico que la que se obtiene del suero (Manning et al., 1987). El alto contenido de ácido siálico en la eCG es responsable de su larga vida en la circulación (Murphy y Martinuk, 1991) y es probable que también sea la causa de su menor afinidad por los receptores de LH/eCG (Couture et al., 1993).

4.5.3.2 Actividad biológica

Los niveles de eCG durante la gestación oscilan entre 1 y 8 $\mu\text{g/ml}$, que comparados con los niveles de LH (5-30 ng/ml) son altísimos. Por esta razón la eCG logra ocupar una buena cantidad de receptores de LH/eCG a pesar de que su afinidad es 10 veces menor que la de la LH (Licht et al., 1979; Roser, 1999; Saint-Dizier, 2003).

En especies diferentes a la equina, tanto la eCG como la LH equina (eLH) se unen a receptores para FSH, por lo que en esas especies tienen efectos como de FSH (Licht et al., 1979; Murphy y Martinuk, 1991). Sin embargo, la actividad de la eCG en la propia especie que la produce es principalmente de LH, ya que la eCG no se une a receptores de FSH ni en los folículos ni en los testículos equinos, solamente a los de LH (Guillou y

Combarnous, 1983; Moore y Ward, 1980). En cambio en la burra la eCG tiene la misma afinidad por los receptores de FSH que para los de LH (Guillou y Combarnous, 1983; Stewart y Allen, 1981). Existen estudios que indican que la subunidad α determina el nivel de actividad de la eCG como LH, mientras que la subunidad β determina en otras especies su actividad biológica como FSH (Chopineau et al., 1997).

El ácido siálico en la eCG juega un papel importante en su actividad biológica, permitiéndole persistir por más tiempo en la circulación después de su secreción o administración. Además, si se elimina el ácido siálico de la eCG se produce un aumento en su actividad biológica de LH (Manning et al., 1987).

Las variaciones de la cantidad de eCG circulante en una yegua gestante pueden ser atribuidas en parte a la combinación del padre y la madre que generan una gestación, por lo que es posible seleccionar sementales y yeguas que produzcan una mayor cantidad de eCG. También se ha comprobado que las variaciones genéticas individuales tienen un gran impacto en la actividad de la eCG, ya que la actividad de LH que tiene la eCG varía por semental y no por periodo de gestación (Manning et al., 1987; Martinuk et al., 1991).

4.5.3.3 Función de la eCG en la gestación equina

Actualmente no se ha logrado entender específicamente cual es la función de la eCG en la gestación de la yegua, sin embargo se sabe que al estar presente estimula la formación de cuerpos lúteos secundarios y/o accesorios que aparecen alrededor del día 40 de la gestación (Amoroso et al., 1948). Además estimulan la producción de progesterona tanto por el cuerpo lúteo primario como por los secundarios/accesorios.

La primera aparición de la eCG coincide con la formación de las copas endometriales. Esta hormona se encuentra presente en el suero de la yegua gestante desde el día 30 (Daels et al., 1995) y sus niveles comienzan a elevarse alrededor del día 35 de la gestación (Meenakshi et al., 2006). Las elevaciones en las concentraciones de progesterona alrededor del día 35 de la gestación, antes de que se formen los cuerpos

lúteos secundarios, están asociadas con el inicio en la secreción de eCG (Stewart y Allen, 1981), lo que sugiere que el papel luteotrópico de la eCG no solamente abarca los cuerpos lúteos secundarios, sino también estimula al cuerpo lúteo primario.

Como resultado de la estimulación del cuerpo lúteo primario y de la formación de cuerpos lúteos suplementarios las concentraciones de progesterona comienzan a elevarse de manera significativa entre el día 35 y 45 de la gestación (Squires et al., 1974c; Holtan et al., 1975; Bergfelt et al., 1989).

Para que se forme un CL suplementario es necesario que antes se desarrolle un folículo dominante, lo que ocurre periódicamente desde que inicia la gestación como resultado de la FSH hipofisiaria, cuya secreción no es inhibida por acción de la progesterona (Squires y Ginther, 1975; Urwin y Allen, 1982). Sin embargo el primer cuerpo lúteo suplementario solamente se formará cuando se comience a secretar eCG, que actuará como LH en un folículo previamente desarrollado por acción de la FSH (Allen, 2001).

La eCG no es indispensable para la gestación, ya que algunas yeguas gestantes con embrión mula prácticamente no producen eCG, a pesar de lo cual logran llevar a término su gestación (Boeta y Zarco, 2005; 2010). Las gestaciones en yeguas servidas con burro (embrión mula), se caracterizan por tener bajas concentraciones de eCG (Stewart y Allen, 1981), lo que al parecer aumenta el riesgo de perder la gestación, pero no hace inevitable que esto ocurra (Boeta y Zarco, 2005; Boeta, 2008). Por esta razón se ha postulado que tal vez la eCG sea necesaria para mantener la gestación de algunas yeguas o cuando una yegua se enfrente a situaciones de riesgo para la gestación, como lo sería la liberación endógena de PGF2 α o una deficiente producción de LH hipofisiaria (Allen, 1984; Allen, 2001; Boeta, 2008; Boeta y Zarco, 2010).

4.5.3.4 Secreción de eCG en gestaciones interespecie e intraespecie

Los équidos tienen la capacidad de reproducirse entre miembros de su género pero de diferente especie, dando como resultado un híbrido generalmente infértil. Los casos más comunes lo son la mula (yegua x burro) y el burdégano (burra x caballo).

La degeneración de las copas endometriales comienza alrededor del día 60 en hembras gestantes con embrión caballo y desaparecen para el día 120-150. En cambio en gestaciones mulares el rechazo inmunológico de las copas endometriales comienza a partir del día 50 y desaparecen para el día 80 a 90 de la gestación (Kidd et al., 1991), por lo que se alcanzan concentraciones bajas de eCG en la circulación (Boeta y Zarco, 2005). Esta degeneración se debe a una reacción inmune celular dada por la proliferación de linfocitos T, B, macrófagos, eosinófilos y células plasmáticas, además de la aparición de anticuerpos citotóxicos dirigidos en contra de los antígenos paternos tipo I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I) de las células de las copas endometriales (Kydd et al., 1991).

El genotipo fetal tiene una influencia muy marcada en el desarrollo de la placenta especialmente en el desarrollo del cinturón coriónico a partir del cual se desarrollan las copas endometriales, en así como en el rechazo inmunológico de las propias copas (Allen y Short, 1997). La transferencia de embriones mula a yeguas o burras receptoras da como resultado una gran diferencia en el desarrollo de las copas endometriales así como en la secreción de eCG. Mientras en la yegua con embrión mula se desarrollaron copas endometriales angostas y pequeñas, que producirán bajas concentraciones de eCG y regresarán en forma prematura, en la burra con un embrión mula las copas endometriales son anchas, grandes y con altas concentraciones de eCG (Allen et al., 1993). Estos resultados sugieren que los embriones híbridos sufren un ataque inmunológico prematuro por parte de la madre si ésta es yegua, a diferencia de la burra en la que el embrión híbrido desarrolla al máximo su capacidad para formar copas endometriales y producir grandes cantidades de eCG.

Tanto en la gestación de caballo con yegua (embrión equino) como en la de caballo con burra (embrión burdégano) las copas endometriales son grandes, anchas y activas, con secreciones altas de eCG que permanecen hasta los 120-140 días de la gestación (Allen, et al 1993). En este tipo de gestaciones el padre es caballo, por lo que se piensa que el genotipo paterno controla el desarrollo de las copas endometriales (Allen y Short, 1997).

Si ocurre muerte embrionaria después de la formación de las copas endometriales, estas continúan secretando eCG de manera autónoma hasta el día en que normalmente regresarían, a pesar que el embrión ya no esté presente, lo que sugiere que están programadas para funcionar en forma autónoma hasta que su función sea limitada por el sistema inmune de la madre (Lofsted, 1986).

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Localización

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del antiguo Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agrícola y Ganadera (CEIEPAG) “Rancho San Francisco” de la FMVZ de la UNAM, ubicado en Chalco, estado de México a 19° 09' 20" latitud norte .

5.2 Animales Experimentales

Se utilizaron 17 yeguas criollas adultas con un peso promedio de 322 kg. Previo al inicio del experimento se realizó un examen físico general así como un examen reproductivo tanto a las yeguas como a los sementales para descartar cualquier patología clínicamente detectable que pudiese alterar la investigación.

Las yeguas se mantuvieron en grupos dentro de corrales con bebederos con agua *ad libitum* y alimentación a base de heno de alfalfa, avena y concentrado.

Se utilizaron dos sementales clínicamente sanos y con una condición corporal de 3. El primero era un caballo criollo de 10 años de edad, con un peso 270 kg y el segundo un burro raza Kentucky de 290 kg. Las 17 yeguas se dividieron en dos grupos en base al semental usado, 9 de ellas fueron servidas con semen de caballo (gestación equina) y las 8 yeguas restantes con semen de burro (gestación mular).

Para programar el servicio, se receló diariamente con un semental para detectar celo. Una vez en celo, se monitoreó el desarrollo folicular de las yeguas mediante ultrasonografía cada tercer día con el objeto de determinar el momento óptimo del servicio, ya sea mediante monta natural o Inseminación artificial.

Para la Inseminación artificial, se colectó el semen mediante una vagina artificial tipo Missouri y se realizó la inseminación transcervical con semen fresco sin diluir.

5.3 Manejo Ultrasonográfico

Se realizó el diagnóstico de gestación a los 12 días post-ovulación con un ultrasonido (US) Chisson 560 de tiempo real y un transductor lineal de 5 Mhz. A partir de ese momento se monitoreó tanto la actividad folicular como la viabilidad del embrión cada tercer día (Ginther, 1986). La actividad folicular se registró con base en el número y tamaño de los folículos, siendo tomados en cuenta aquellos mayores a 20 mm de diámetro, para posteriormente calcular su volumen en mm^3 . En cuanto a la viabilidad fetal, se confirmaba mediante la detección de latido cardiaco, movimiento fetal y/o pulsación del cordón umbilical del producto. Si alguna yegua no quedaba gestante se repetía el ciclo de detección de calores y servicios para lograr la gestación. A partir del día 60 de la gestación se utilizó un US Aloka 210, Echo Camera SSD-506, con un transductor de 3.5 MHz.

5.4 Tratamiento

En el día 39 de la gestación tanto equina como mular, se les administró un antagonista de GnRH (Antarelix, Ac-D-Nal, D-Phe (pCI), D-Pal, Ser, Tyr, D-Hci, Leu, Lys-(iPr), Pro, D-Ala-NH₂, GeneCust Europe, Luxemburgo) a una dosis de 0.01 mg/kg (Guillaume et al., 2002) por vía intravenosa diariamente por 7 días y después se aplicó la hormona por vía subcutánea en dosis de 0.07 mg/kg una vez a la semana durante 5 semanas, ya que se ha visto que esta vía de administración es igualmente efectiva que la administración endovenosa diaria para mantener el efecto del Antarelix (Guillaume, 2009, comunicación personal).

Diagrama del experimento

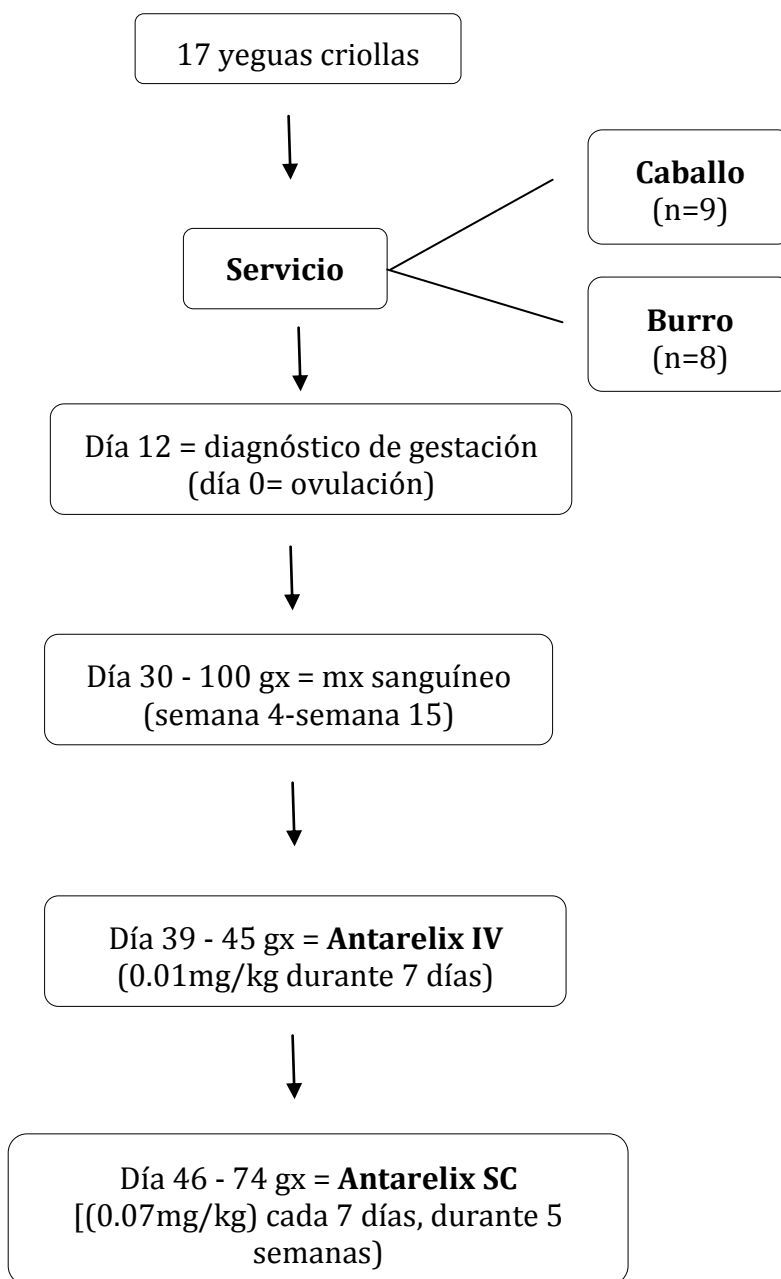


Figura 2. Diagrama que muestra las actividades realizadas durante el experimento. gx= gestación, mx= muestreo, n= número de yeguas servidas ya sea con burro o con caballo.

5.5 Muestreo de sangre y procesamiento de muestras

A partir del día 30 post-ovulación se iniciaron muestreos sanguíneos en ambos tipos de gestación dos veces a la semana hasta el día 100 de la gestación. Las muestras sanguíneas se obtuvieron mediante venopunción de la vena yugular, utilizando tubos al vacío con gel activador de suero. Las muestras se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 10 minutos dentro de la primera hora posterior a su obtención, para separar el suero que se mantuvo a -20°C hasta el momento de realizar las determinaciones hormonales en el laboratorio de Endocrinología del departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

El estradiol fue medido por una técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA) de tipo competitivo realizado en placas de microtitulación recubiertas con anticuerpos de conejo contra estradiol (R4972, University of California, Davis) (Munro y Stabenfelt, 1984) diluido 1:5000. La sensibilidad del ensayo fue de 0.80 pg/ml con un coeficiente de variación intraensayo e interensayo de 4.66% y 6.30% respectivamente.

Las concentraciones de eCG fueron determinadas mediante ELISA de sándwich en placas de microtitulación, (PMSG ELISA^{DRG} Diagnostics, Germany) (Voller et al, 1978). El ensayo tuvo una sensibilidad de 8.18 mUI/ml y un coeficiente de variación intraensayo de 3.25% para los valores bajos y 4.78% para los valores altos.

5.6 Análisis estadístico

Las concentraciones hormonales semanales promedio, así como el número promedio y diámetro promedio de los folículos se compararon entre grupos mediante análisis de varianza para mediciones repetidas.

6. RESULTADOS

6.1 Comparación entre yeguas servidas con caballo (gestaciones equinas) y yeguas servidas con burro (gestaciones mulares).

6.1.1 Concentraciones de eCG

En la figura 3 se muestran las concentraciones semanales promedio de eCG desde la semana 4 a la semana 15 en las gestaciones equinas (gx caballo) y mulares (gx burro). Las concentraciones de la hormona fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) en las gestaciones equinas que en las gestaciones mulares desde la semana 6 hasta la semana 12.

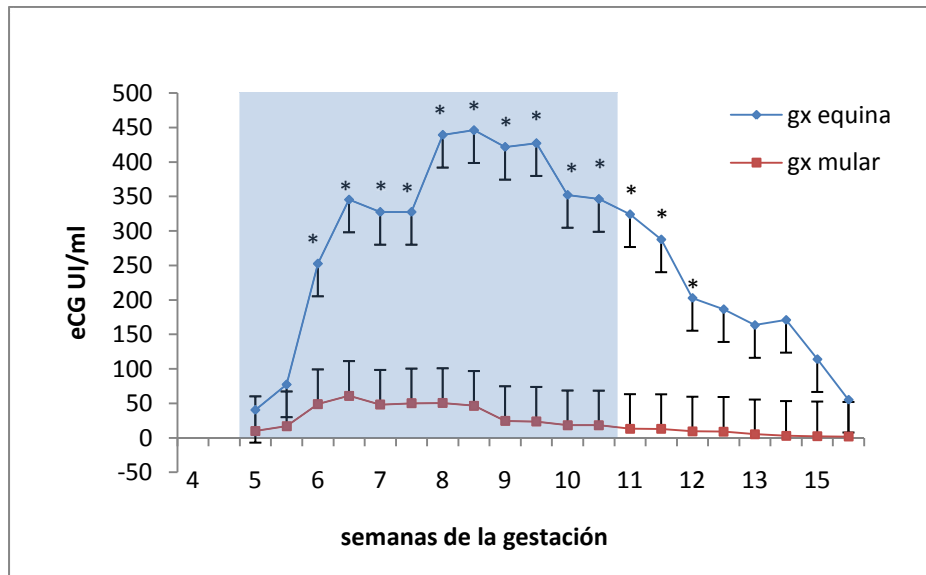


Figura 3. Concentraciones medias de eCG entre la semana 4 y 16 de la gestación equina y mular. El área sombreada representa el periodo de tratamiento con Antarelix. Las barras representan el error estándar. Los asteriscos indican las semanas en las que existió diferencia entre los dos tipos de gestación ($p < 0.05$).

6.1.2 Desarrollo folicular

En la figura 4 se muestra el número promedio de folículos mayores a 20 mm de diámetro entre las semanas 4 y 16 de la gestación equina y mular. El número de folículos en las yeguas servidas con caballo fue mayor que en las yeguas servidas con burro desde la semana 6.5 hasta la semana 9 ($p < 0.05$). El mayor número de folículos mayores a 20 mm en las gestaciones equinas se produjo durante el tratamiento con Antarelix, a diferencia de las gestaciones mulares, en las que durante el tratamiento se redujo gradualmente el número de folículos mayores a 20 mm, hasta llegar a desaparecer desde la semana 9.5 hasta la semana 12.5.

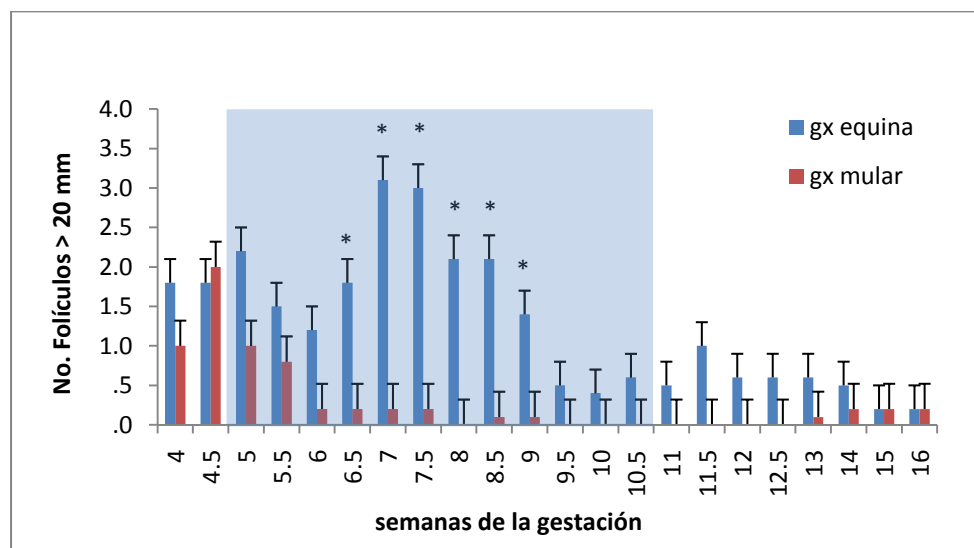


Figura 4. Número promedio de folículos mayores a 20 mm de diámetro entre la semana 4 y 16 de la gestación equina y mular. El área sombreada representa el periodo de tratamiento con Antarelix. Las barras representan el error estándar. Los asteriscos indican las semanas en las que existió una diferencia entre los dos tipos de gestación ($p < 0.01$).

6.1.3 Folículos Anovulatorios Hemorrágicos (FAH's)

Cabe mencionar que el desarrollo de folículos anovulatorios hemorrágicos (FAH's) únicamente se presentó en las gestaciones equinas. En la Figura 5 se presenta el número promedio de este tipo de estructuras conforme aparecieron durante los diferentes periodos del estudio.

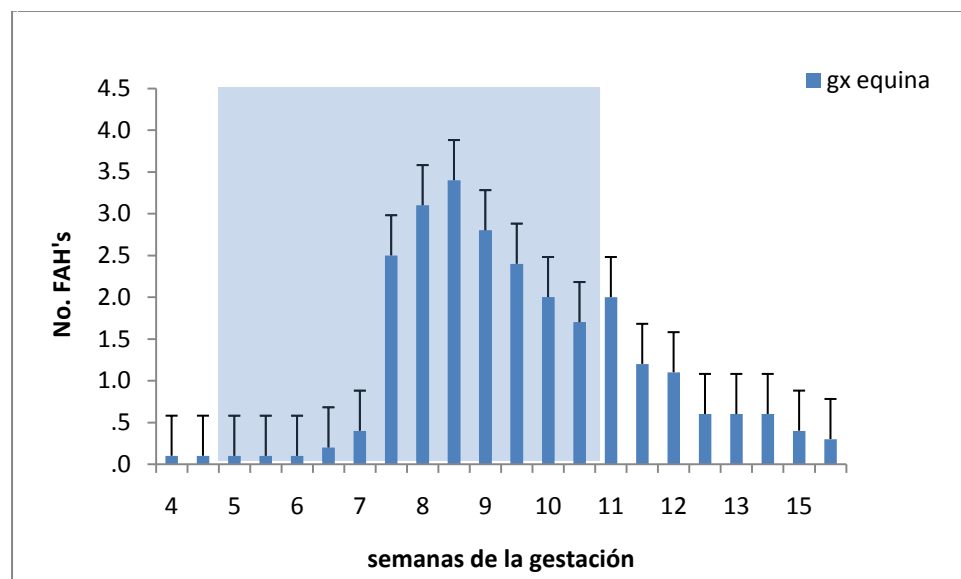


Figura 5. Número promedio de folículos anovulatorios hemorrágicos (FAH's) que aparecieron durante la semana 4 a 15 de la gestación equina. El área sombreada representa el tiempo de tratamiento con el Antarelix. Las barras representan el error estándar.

6.1.4 Volumen folicular (incluyendo FAH's)

En la figura 6, se muestra el volumen folicular promedio para ambos tipos de gestación entre la semana 4 y 15, tomando en cuenta todos aquellos folículos (normales o FAH's) mayores a los 20 mm de diámetro al momento de hacer la observación ultrasonográfica. En las gestaciones mulares el volumen folicular siempre fue menor que en las gestaciones equinas, aunque las diferencias entre ambos tipos de gestación solamente fueron significativas ($p < 0.05$) entre la semana 7.5 y la semana 9 de la gestación, justamente a la mitad del tratamiento con Antarelix.

El máximo volumen folicular en gestaciones equinas yeguas servidas con caballo se alcanzó en la semana 8.5 (durante el tratamiento con Antarelix), con 177,810 mm³, mientras que en las gestaciones mulares el máximo volumen se alcanzó en la semana 4.5 (antes del tratamiento), con tan sólo 15,883 mm³.

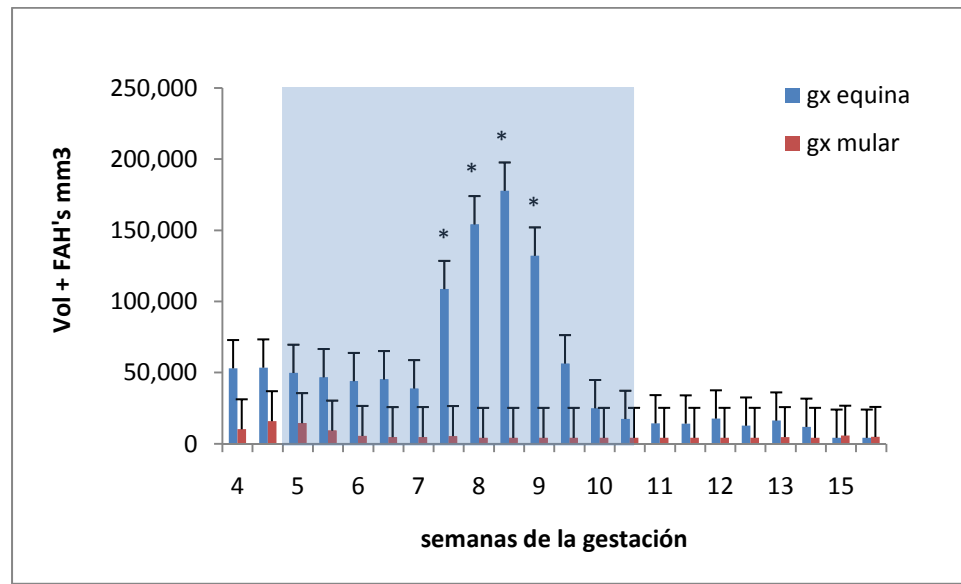


Figura 6. Volumen folicular promedio entre las semanas 4 y 16 de la gestación equina y mular. El área sombreada representa el tiempo de tratamiento con Antarelix. Las barras representan el error estándar. Los asteriscos indican las semanas en las que existió diferencia entre tipos de gestación ($p < 0.01$).

6.1.5 Volumen folicular (excluyendo FAH's)

En la figura 7 se muestra el volumen folicular promedio en ambos tipos de gestación, excluyendo los folículos anovulatorios hemorrágicos (FAH's), entre las semanas 4 y 15 de la gestación. A pesar de no tomar en cuenta la presencia de los FAH's, esta gráfica coincide con la anterior, ya que las gestaciones equinas tuvieron un mayor volumen folicular comparado con las gestaciones mulares, siendo las diferencias entre los dos tipos de gestaciones significativas ($p < 0.05$) entre la semana 7 y 9 de la gestación, excepto en la semana 8.5. Nótese que la escala de la figura 7 es diferente a la de la figura 6.

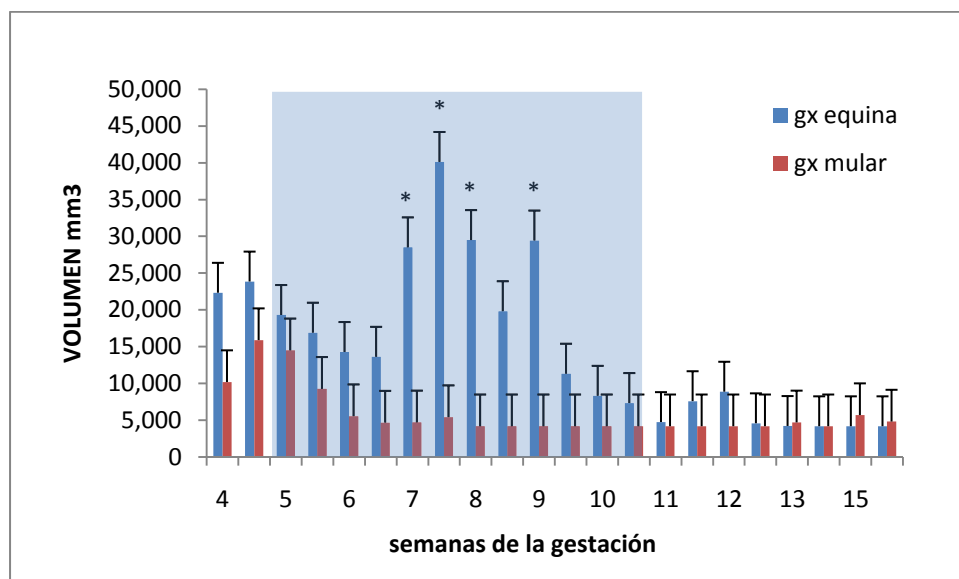


Figura 7. Volumen folicular promedio (excluyendo FAH's) de la semana 4 a la 16 de la gestación equina y mular. El área sombreada representa el tiempo de tratamiento con Antarelix. Las barras representan el error estándar. Los asteriscos indican las semanas en las que existió una diferencia ($p < 0.05$).

6.1.6 Concentraciones de E2

En la figura 8 se muestran las concentraciones de E2 de la semana 4 a la semana 15 en las gestaciones equinas y mulares. Las concentraciones máximas de E2 en ambos tipos de gestaciones se encontraron en la semana 4 de la gestación (antes de iniciar el tratamiento). Las diferencias entre los grupos no fueron significativas ($p > 0.05$).

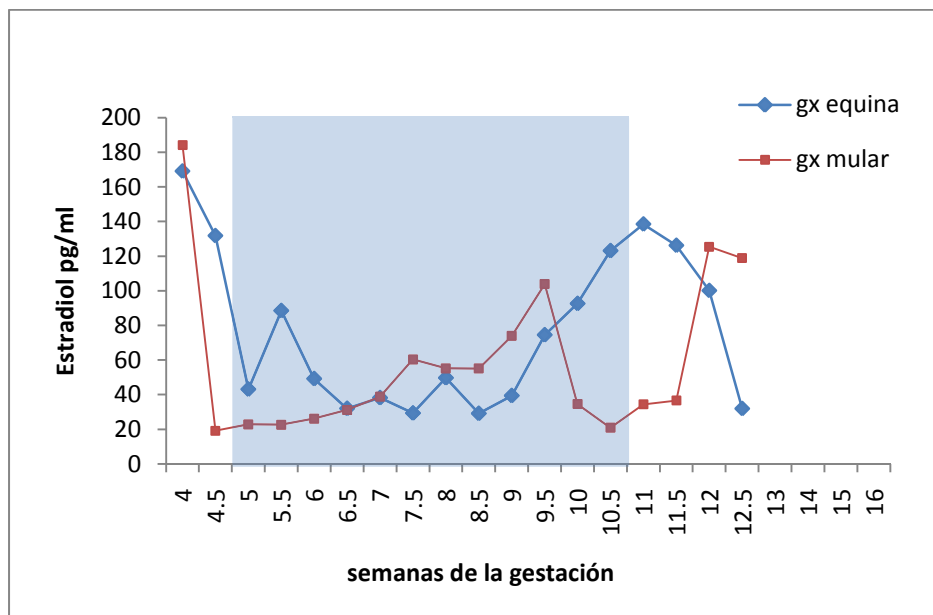


Figura 8. Concentraciones promedio de estradiol entre la semana 4 y 16 de la gestación equina y mular. El área sombreada representa el tiempo de tratamiento con Antarelix. No hubo diferencias significativas ($p>0.05$)

6.2 Comparaciones hormonales entre las yeguas que abortaron y las que mantuvieron una gestación normal

Ninguna yegua gestante con caballo abortó, por lo que solamente se compararon las diferencias entre las gestaciones mulares que mantuvieron una gestación normal y las que la perdieron.

6.2.1 Concentraciones de eCG

Como se observa en la figura 9, las concentraciones promedio de eCG de las yeguas que abortaron comenzaron a ser menores que las de yeguas con gestación normal a partir de la semana 7 de la gestación, siendo las diferencias significativas en las semanas 8 y 8.5.

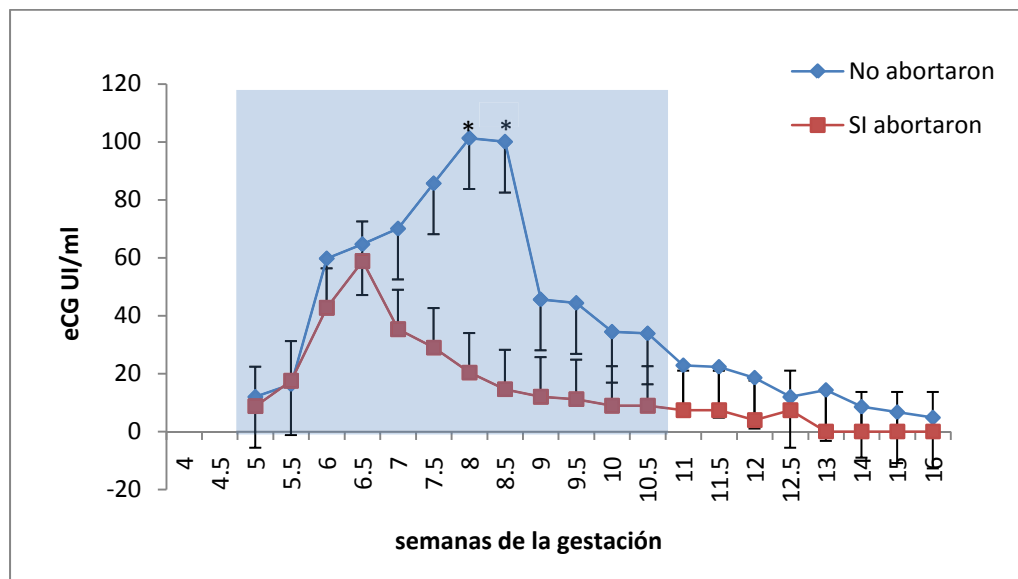


Figura 9. Concentraciones promedio de eCG en gestaciones mulares de la semana 4 a la 16 en yeguas con gestaciones normales y en yeguas que abortaron. El área sombreada representa el tiempo de tratamiento con Antarelix. Las barras representan el error estándar. Los asteriscos indican las semanas en las que existió una diferencia entre las yeguas que abortaron y las que no lo hicieron ($p < 0.05$).

6.2.2 Concentraciones de E2

En la figura 10 se muestran las concentraciones promedio de estradiol desde la semana 4 a la semana 16 de la gestación en las yeguas servidas con burro que abortaron y aquellas que no lo hicieron. Las concentraciones promedio de estradiol en las yeguas que perdieron la gestación tendieron a ser menores a las de las yeguas con gestación normal durante todo el periodo de estudio, aunque las diferencias solo fueron significativas entre las semanas 9, 9.5 y 12 de la gestación.

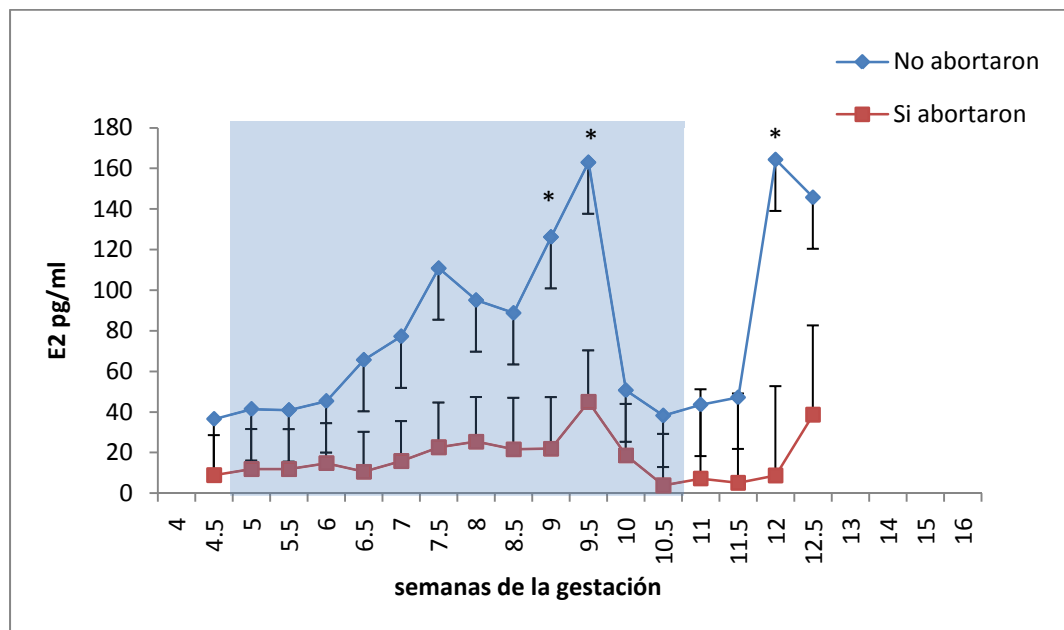


Figura 10. Concentraciones promedio de estradiol en gestaciones mulares de la semana 4 a la 16 en yeguas que tuvieron gestación normal y en yeguas que abortaron. El área sombreada representa el tiempo de tratamiento con Antarelix. Las barras representan el error estándar. Los asteriscos indican las semanas en las que existió una diferencia ($p < 0.05$).

6.2.3 Desarrollo folicular

En la figura 11 se muestra el número promedio de folículos mayores a 20 mm de diámetro de la semana 4 a la 16 en yeguas servidas con burro que abortaron y en las que no lo hicieron. Solamente existieron diferencias significativas entre ambos grupos en la semana 4.5 de la gestación.

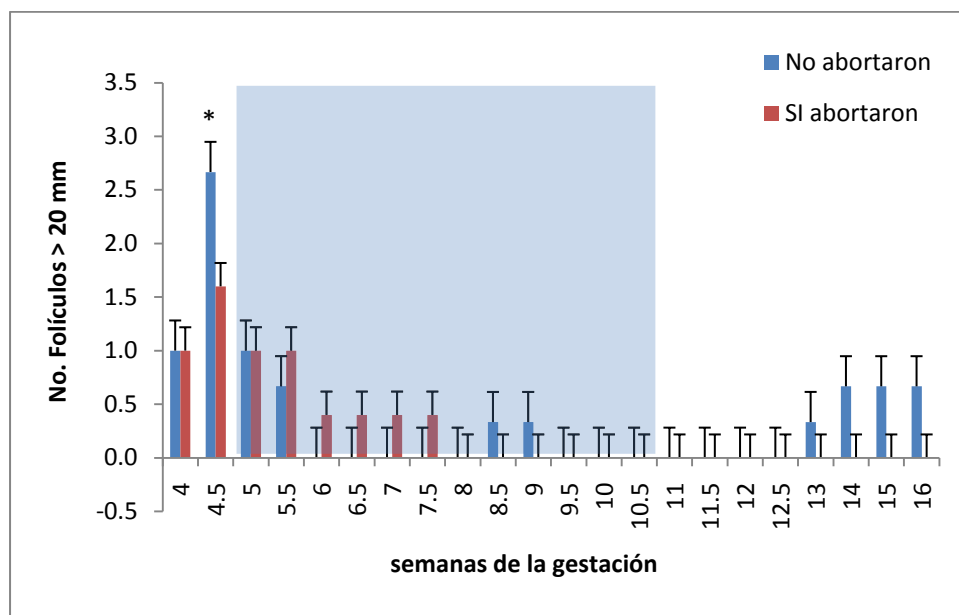


Figura 11. Número promedio de folículos mayores a 20 mm de diámetro en gestaciones mulares de la semana 4 a la 16 en yeguas que mantuvieron la gestación y en yeguas que abortaron. El área sombreada representa el tiempo de tratamiento con Antarelix. Las barras representan el error estándar. El asterisco indica la semana en la que existió una diferencia ($p < 0.05$).

6.2.4 Volumen folicular

En la figura 12 se muestra el volumen folicular promedio desde la semana 4 a la 15 de la gestación en yeguas servidas con burro que abortaron y en gestaciones normales. Solamente existieron diferencias significativas entre ambos grupos en la semana 4.5 de la gestación ($p < 0.05$).

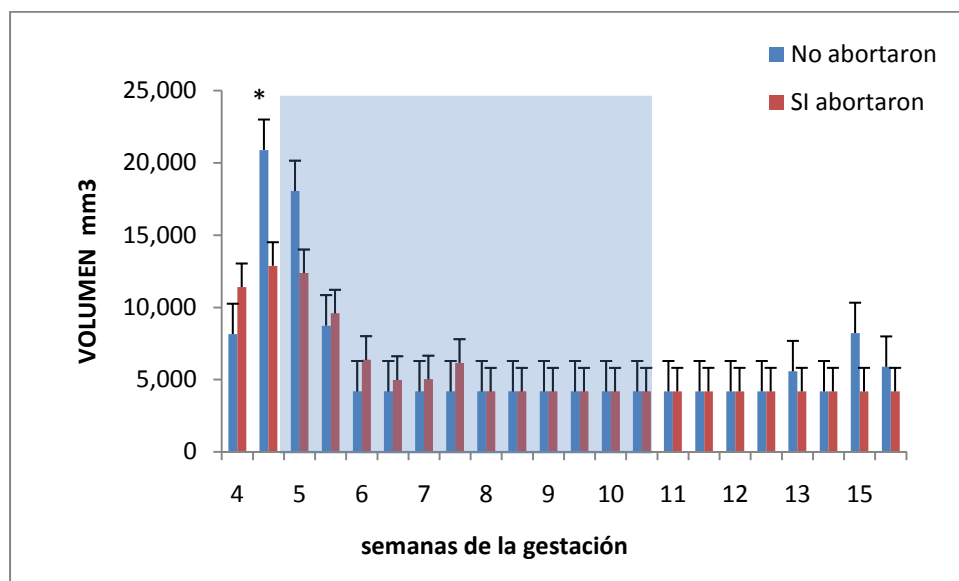


Figura 12. Volumen folicular promedio de la semana 4 a la semana 16 en gestaciones mulares en yeguas con gestación normal y en yeguas que abortaron. El área sombreada representa el tiempo de tratamiento con Antarelix. Las barras representan el error estándar. El asterisco indica la semana en la que existió una diferencia ($p < 0.05$).

7. DISCUSIÓN

Se sabe que la secreción de gonadotropinas hipofisiarias en la yegua es dependiente de GnRH, aunque el grado de dependencia es distinto para la LH que para la FSH, ya que en yeguas ovariectomizadas inmunizadas activamente contra GnRH la secreción de LH se reduce en un 90 ó 100%, mientras que la FSH sólo se reduce en un 50% (Garza et al., 1988). Por esta razón, aunque en esta investigación no se haya medido la secreción de gonadotropinas, se asume que la administración de un antagonista de GnRH como el Antarelix en las dosis empleadas en el presente trabajo resulta en una completa supresión de la secreción de LH, pero solamente en una reducción marginal en la secreción de FSH (Guillaume et al., 2002; Taylor et al., 2004).

También se conoce que la secreción de eCG por las copas endometriales de la yegua gestante es autónoma y no depende del control hipotalámico (Allen y Moor, 1972), por lo que en la presente discusión se estima que los efectos derivados de la administración del antagonista no son mediados por cambios en la secreción de eCG.

Como puede observarse en la figura 3, las concentraciones de eCG siempre fueron mayores en las gestaciones equinas que en las gestaciones mulares, lo que coincide con estudios previos en los que se han comparado ambos tipos de gestaciones sin administración de anti-GnRH confirmando la ausencia de control hipotálamo sobre la producción de la eCG. (Boeta y Zarco, 2005, 2010).

En las gestaciones equinas, la administración de Antarelix no suprimió el desarrollo folicular, ya que tanto el número de folículos mayores a 20 mm (figura 4) como el volumen folicular (figuras 6 y 7) alcanzaron sus máximos niveles durante el periodo de administración del antagonista. Dicho desarrollo ocurrió a pesar del bloqueo en la secreción de LH hipofisiaria, lo que sugiere que puede estar respaldado por la secreción de eCG, ya que el mayor desarrollo folicular se alcanzó precisamente durante el pico de su secreción y para la semana 10 sufrió una reducción gradual coincidiendo con la disminución en la secreción de eCG.

El importante papel de la eCG para mantener el desarrollo de folículos mayores a 20 mm en ausencia de LH hipofisiaria es claramente demostrado por lo que ocurrió en las gestaciones con embrión mula (deficientes en secreción de eCG), en las cuales el tratamiento con Antarelix suprimió rápida y completamente el desarrollo y volumen de folículos mayores a 20 mm (figuras 4, 5, 6 y 7). Estos resultados son consistentes con la inhibición en el desarrollo folicular que ocurre a partir del segundo día de administración de Antarelix a yeguas vacías, las cuales no tienen secreción de eCG (Watson et al., 2000; Guillaume et al., 2002), las cuales tampoco tienen eCG.

Por otra parte, la supresión total en el desarrollo folicular en las gestaciones mulares con deficiente secreción de eCG confirman que el Antarelix logró suprimir la secreción de LH hipofisiaria, por lo que en ausencia tanto de LH como de eCG no se pudo mantener el desarrollo folicular.

El hecho de que las yeguas servidas con caballo tratadas con Antarelix mantuvieran el desarrollo de folículos mayores a 20 mm no significa que la función ovárica haya sido normal. Por lo general, entre la semana 5 y 12 de la gestación se produce la ovulación y/o luteinización de folículos dominantes, ocasionando una reducción en el número de folículos grandes (Allen y Stewart, 1993). Lo anteriormente descrito no ocurrió en este tipo de gestaciones, en las que el incremento en el número y volumen folicular (figuras 4 y 6) indica una falla al menos parcial en la ovulación y/o luteinización folicular ya que en 8 de las 9 yeguas se desarrollaron FAH's.

Lo anterior pudo deberse a la acción conjunta de la eCG y la FSH hipofisiaria, la cual no es suprimida en su totalidad por el Antarelix (Guillaume et al., 2002). En cambio, la supresión en el desarrollo folicular de las yeguas servidas con burro tratadas con Antarelix indica que, en ausencia de LH, la presencia de la eCG es fundamental para mantener el desarrollo folicular. En cambio, la eCG por sí misma no es capaz de inducir la ovulación de los folículos preovulatorios, los cuales en las gestaciones con embrión equino simplemente se mantuvieron o se transformaron en FAH's, luteinizándose en forma gradual.

Otra evidencia de que la sola presencia de eCG no es suficiente para mantener una función folicular normal la constituye el hecho de que las concentraciones de estradiol durante el periodo de tratamiento fueron similares en ambos tipos de gestación (figura 8), a pesar de que tanto el número de folículos grandes (figura 4) como su volumen (figura 7) fueron mucho mayores ($p < 0.01$) en las gestaciones equinas que en las gestaciones mulares, lo que sugiere una deficiente esteroidogénesis en los folículos presentes en las gestaciones equinas. Además, las yeguas con embrión equino presentaron menores concentraciones de estradiol durante el tratamiento con Antarelix, justamente en el momento en que el número y volumen folicular alcanzó su máximo en ese tipo de yeguas, lo que indica una disociación entre volumen folicular y su actividad endócrina, probablemente debida a una degeneración funcional de folículos persistentes que no tuvieron la oportunidad de ovular o luteinizarse debido a la ausencia de LH hipofisiaria.

Además de lo antes mencionado, también se puede presentar una falla en la ovulación por una insuficiente secreción de gonadotropinas para desencadenar la ovulación o bien por una insuficiente producción de estrógenos por parte del folículo anovulatorio (McCue, 2000). En estudios realizados durante la época de transición otoñal se ha observado que el desarrollo de un folículo dominante anovulatorio y su transformación en FAH's se produce cuando hay deficiencias relativas de LH. Esta deficiencia en la secreción de LH conlleva a una reducción del flujo sanguíneo y concentraciones de diversas sustancias en el líquido folicular, incluyendo factores foliculares supresores de la secreción de FSH, como la inhibina, lo que provoca una elevación en las concentraciones de FSH en el plasma (Acosta et al., 2004), favoreciendo la formación de los FAH's.

Se sabe que en gestaciones mulares la eCG no es indispensable para llevar a término la gestación (Boeta y Zarco, 2005), aunque su ausencia si parece favorecer la ocurrencia de algunos tipos de aborto (Boeta y Zarco, 2010). Se ha postulado que la LH de origen hipofisiario podría ser responsable de mantener la función lútea y evitar el aborto en yeguas gestantes que no producen eCG (Boeta y Zarco, 2005; 2010). Aunque la incidencia de abortos en gestaciones mulares es siempre mayor que en gestaciones de yeguas servidas con caballo (Boeta y Zarco, 2005; 2010), la incidencia de aborto encontrada en el presente trabajo en gestaciones mulares (62.5%) fue mucho mayor a la

reportada previamente (36.8%), lo que probablemente fue debido a que en el presente trabajo las yeguas servidas con burro, además de ser deficientes en eCG, también lo eran en LH como resultado del tratamiento con Antarelix.

Por otra parte, el hecho de que las concentraciones de eCG en las yeguas servidas con burro que abortaron fueron significativamente menores que en aquellas que no abortaron (figura 9) apoya el concepto de que la presencia de LH hipofisiaria puede ser importante para mantener la gestación sobre todo en casos de deficiencia extrema en la secreción de eCG.

Aunque las concentraciones máximas de eCG alcanzadas por las gestaciones mulares que no abortaron (figura 9) fueron mucho menores que las de las gestaciones equinas (figura 3), fueron suficientes para mantener la gestación a pesar de que su producción de LH estaba siendo inhibida por la administración de Antarelix. Lo anterior sugiere que durante la gestación equina (yegua con caballo) se secretan cantidades de eCG mucho mayores a las requeridas para mantener la función lútea y la gestación, por lo que existe un amplio margen de seguridad. En cambio, en gestaciones mulares se producen concentraciones marginales de eCG que en muchos casos son suficientes, por sí mismos o con la ayuda de LH, para mantener la gestación, mientras que en otros casos resultan insuficientes y pueden resultar en aborto, lo que se agrava si se provoca una supresión de la secreción de LH.

Como se mencionó anteriormente, las concentraciones de estradiol no tuvieron diferencias significativas entre las gestaciones mulares y equinas (figura 8), en cambio en el caso de las yeguas con gestaciones mulares que no abortaron, presentaron concentraciones superiores a las de las yeguas que si abortaron (figura 10), presentándose diferencias significativas en la semana 9.5, durante el tratamiento. Estas diferencias pueden estar relacionadas con la mayor concentración de eCG en las yeguas que mantuvieron su gestación.

En yeguas vacías la aplicación de un antagonista retarda el crecimiento folicular (Checura et al., 2009), y disminuye el diámetro folicular (Guillaume et al., 2002). En este estudio tanto el número como el volumen folicular (figura 11 y 12) fueron mayores en las yeguas que no abortaron en comparación a las yeguas que si lo hicieron, lo que también podría estar relacionado con las diferencias en la secreción de eCG entre ambos grupos de yeguas.

8. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo indican que el desarrollo folicular se mantuvo en las yeguas con gestaciones equinas a pesar de haberse suprimido la liberación de LH hipofisiaria mediante el tratamiento con el antagonista de GnRH.

En este mismo tipo de gestación, la acción de eCG permitió que en los ovarios se mantuviera el desarrollo de folículos a pesar de la supresión de la secreción de LH. Sin embargo dichos folículos no secretaron altas concentraciones de estradiol y muchos de ellos se transformaron en FAH's y no ovularon. En cambio, en las yeguas con gestaciones mulares la ausencia simultanea de LH y eCG resultó en la regresión de todos los folículos mayores a 20 mm.

Estos resultados sugieren que durante la gestación equina la eCG juega un papel de apoyo en el desarrollo folicular, pero sigue requiriéndose la secreción de LH hipofisiaria para mantener una función folicular normal y para permitir la ovulación y/o luteinización de los folículos que se desarrollan durante la gestación.

9. LITERATURA CITADA

Acosta TJ, Beg MA, Ginther OJ. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. *Biol Reprod* 2004; 71: 637-642.

Adashi EY. Endocrinology of the ovary. *Hum Reprod* 1994; 9: 815-827.

Albano C, Smits J, Camus M, Riethmüller-Winzen H, Van Steirteghem P, Devroey P. Comparison of different doses of gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 1997; 67: 917-922.

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

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

Alexander SL, Irvine CH. FSH and LH. In: McKinnon AO, Voss JL, editors. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993; 121-132.

Al-Inany HG, Youssef MAFM, Aboulghar M, Broekmans F, Sterrenburg M, Smit J, Abou-Setta AM. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011, Issue 5. Art. No.: CD001750. DOI: 10.1002/14651858.CD001750.pub3

Allen WR. Immunological aspects of the endometrial cup reaction and the effect of xenogeneic pregnancy in horses 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(1): 283-304.

Allen WR. The physiology of early pregnancy in the mare. *Proceedings of the 46th American Association of Equine Practitioners Annual Convention*. San Antonio, Texas, USA, November 26 to 29, 2000. pp 338-354

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

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, Skidmore J, Antczak DF. Interespecies and extraespecies equine pregnancies. In: McKinnon AO, Voss JL, editors. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993; 536-553.

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

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

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

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

Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. Follicular fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol Reprod* 2001;64: 24-33.

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

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

Bergfelt DR. Anatomy and physiology of the mare. In: Samper JC, editor. *Equine breeding Management and Artificial Insemination*. 2nd ed. British Columbia: Saunders Elsevier, 2009: 113-131.

Bergfelt DR, Ginther OJ. Delayed follicular development and ovulation following inhibition of FSH with equine follicular fluid in the mare. *Theriogenology* 1985; 24: 99-108.

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

Bergfelt DR, Ginther OJ. Relationships between FSH surges and follicular waves during the estrous cycle in mares. *Theriogenology* 1993; 39:781-796.

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

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

Blithe DL. Applications for GnRH antagonists. *Trends Endocrinol. Metab* 2001; 12: 238-240.

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 Doctorado). México DF: FMVZ-UNAM, 2008.

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

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

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

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

Bousfield GR, Butnev VY, Butnev VY. Identification of Twelve O-Glycosylation Sites in Equine Chorionic Gonadotropin b and Equine Luteinizing Hormone b by Solid-Phase Edman Degradation. *Boil Reprod* 2001

Briant C, Ottogalli M, Morel M, Guillaume D. Use of a GnRH antagonist, antarelix, associated or not with hCG, to control ovulation in cyclic pony mares. *Dom Anim Endocrinol* 2003; 24:305-322.

Bridges TS, Davidson TR, Chamberlain CS, Geisert RD, Spicer LJ. Changes in follicular fluid steroids, insulin-like growth factors (IGF) and IGF-binding protein concentration, and proteolytic activity during equine follicular development. *J Anim Sci* 2002; 80: 179-190.

Brüssow KP, Schneider F, Nürnberg G. Alteration of gonadotrophin and steroid hormone release, and of ovarian function by a GnRH antagonist in gilts. *Anim Reprod Sci* 2001; 66: 117-128.

Chabbert-Buffet N, Olivennes F, Fauser BCJM, Bouchard P, Frydman R. The role of GnRH antagonist in supporting ovarian hyperstimulation protocols. In: Leung PCK, Adashi EY, editors. *The Ovary*. 2nd ed. Elsevier academic Press, 2004; 451-460.

Checura CM, Beg MA, Gastal EL, Gastal MO, Witbank MC, Parrish JJ *et al*. Effect of suppression of FSH with a GnRH antagonist (Acyline) before and during follicle deviation in the mare. *Reprod Dom Anim*. 2009; 44: 504-5011.

Chopineau M, Martinat N, Marichatou H, Troispoux C, Auge-Gouilou C, Stewart F, *et al*. Evidence that the alfa-subunit-influences the specificity of receptor binding of the equine gonadotrophins. *J Endocrinol* 1997; 155: 241-245.

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

Clegg MT, Cole HH, Howard CB, Pigon H. The influence of foetal genotype on equine gonadotrophin secretion. *J Endocrinol* 1982; 25: 245-248.

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: 57-68.

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

Combarnous Y. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocr Rev* 1992; 13:670–691.

Conley AJ, Howard HJ, Slanger WD, Ford JJ. Steroidogenesis in the preovulatory porcine follicle. *Biol Reprod* 1994; 51:655–661.

Conn PM, Jennes L, Janovick JA. GnRH. In: Knobil E, Neil D, editors. Encyclopedia of Reproduction. Academic Press, 1999; 464-467.

Conn PM, Crowley Jr. WF. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. Annu Rev Med 1994; 45: 391-405.

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

Culler MD, Negro-Villar A. Pulsatile follicle-stimulating hormone secretion is independent of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH): pulsatile replacement of LHRH bioactivity in LHRH-immunoneutralized rats. Endocrinology 1987; 120: 2011-2021.

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

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

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

Daels PF, Albrecht BA, Mohammed HO. In vitro regulation of luteal function in mares. Reprod. Dom Anim 1995; 30: 211-217.

Daels PF, Albrecht, and H.O. Mohammed. Equine chorionic gonadotropin regulates luteal steroidogenesis in pregnant mares. Biol Reprod 1998; 59: 1062–1068.

Danforth DR, Williams RF, Gordon K, Hodgen GD. Inhibition of Pituitary Gonadotropin Secretion by the Gonadotropin-Releasing Hormone Antagonist Antide. I. In Vitro Studies on Mechanism of Action. *Endocrinol* 1991; 128: 2036-2040.

Deanesly R. Germ cell proliferations in the fetal horse ovary. *Cell Tissue Res.* 1977; 185: 361-371.

Deghenghi R, Boutignon F, Wüthrich P, Lenaerts V. Antarelix (EP 24332) a novel water soluble LHRH antagonist. *Biomed Pharmacother* 1993; 47: 107–110.

Devoto L, Kohen P, Vega M, Castro O, González RR, Retamales I, *et al.* Control of human luteal steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 186:137-141.

Driancourt MA, Fry RC, Clarket IJ, Cahill LP. Follicular growth and regression during the 8 days after hypophysectomy in sheep. *J Reprod Fert* 1987; 79: 635-641.

Díaz Chico BN. Bioquímica básica de las hormonas esteroideas. *Biología y Clínica del Cáncer. Biocáncer.* 2004; 2: 1-22.

Ditkoff EC, Cassidenti DL, Paulson RS, Sauer MV, Paul WL, Rivier J, *et al.* The gonadotropin-releasing hormone antagonist (Nal-Glu) acutely blocks the luteinizing hormone surge but allows for resumption of folliculogenesis in normal women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1991; 165(6 Pt 1): 1811-1817.

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

Donadeu FX, Ginther OJ. Follicular waves and circulating concentrations of gonadotrophins, inhibin and oestradiol during the anovulatory season in mares. *Reproduction* 2002; 124: 875-885.

Donadeu FX, Pedersen HG. Follicle development in mares. *Reprod Dom Anim* 2008; 43 Suppl 2: 224-231.

Evans MJ, Kitson NE, Alexander SL, Irvine CHG, Turner JE, Perkins NR, *et al.* Effectiveness of an antagonist to gonadotrophin releasing hormone on the FSH and LH response to GnRH in perfused equine pituitary cells, and in seasonally acyclic mares. *Anim Reprod Sci* 2002; 73: 37-51.

Fay JE, Douglas RH. Changes in thecal and granulosa cell LH and FSH receptor content associated with follicular fluid and peripheral plasma gonadotrophin and steroid hormone concentrations in preovulatory follicles of mares. *J Reprod Fertil Suppl* 1987; 35: 169-181.

Fluker MR, Marshall LA, Monroe SE, Jaffe RB. Variable ovarian response to gonadotropin-releasing hormone antagonist-induced gonadotropin deprivation during different phases of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 912-919.

Fortune JE, Rivera GM, Yang MY. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 109-126.

Fraser HM, Grome NP, McNeilly AS. Follicle-stimulating hormone-inhibin B interactions during the follicular phase of the primate menstrual cycle revealed by gonadotropin-releasing hormone antagonist and antiestrogen treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1365-1369.

Garza F Jr, Thomson DL Jr, Mitchell PS, Wiest JJ. Effects of active immunization against gonadotropin releasing hormone on gonadotropin secretion after ovariectomy and testosterone propionate administration to mares. *J Anim Sci* 1988;66: 479-486.

Gastal EL, Gastal MO, Wiltbank MC, Ginther OJ. Follicle deviation and intrafollicular and systemic estradiol concentrations in mares. *Biol Reprod* 1999; 61:31-39.

Gerard N, Monget P. Intrafollicular insulin-like growth factor-binding protein levels in equine ovarian follicles during preovulatory maturation and regression. *Biol Reprod* 1998; 58: 1508-1514.

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

Gillics PS, Faulds D, Balfour JA, Perry CM. Ganirelix. *Drugs* 2000; 59: 107-111.

Ginther OJ. Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare 2nd ed. WI USA: Equiservices Cross Plains, 1986; 195-217.

Ginther OJ. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. *J Reprod Fert* 1990; 90: 311-320.

Ginther OJ. Reproductive Biology of the Mare: Basic and applied aspects, 2nd ed. Cross Plains, WI USA: Equiservices Publishing, 1992.

Ginther OJ. Major and minor follicular waves during the equine estrous cycle. *J Eq Vet Sci* 1993; 13: 18-25.

Ginther OJ. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61:61-79.

Ginther OJ, First NL. Maintenance of the corpus luteum in hysterectomized mares. *Am J Vet Res* 1971; 32: 1687-1691.

Ginther OJ, Bergfelt DR. Associations between FSH concentrations and major and minor follicular waves in pregnant mares. *Theriogenology* 1992; 38: 807-821.

Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod* 2001; 65: 638-647.

Ginther OJ, Beg MA, Donadeu FX, Bergfelt DR. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci* 2003; 78: 239-257.

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

Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Checure CM, Beg MA. Dose-response study of intrafollicular injection of insulin-like growth factor-I on follicular fluid factors and follicle dominance in mares. Biol. Reprod. 2004b; 70: 1063-1069.

Glister C, Tannetta DS, Groome NO, Knight PG. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. Biol Reprod 2001;65: 1020-1028.

Glister C, Kemp CF, Knight PG. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. Reproduction 2004; 127: 239-254.

Gore-Langton ER, Armstrong D. Follicular steroidogenesis and its control. In: Knobil E, Neil JD, editors. The Physiology of Reproduction. 2nd ed. New York: Raven Press Ltd, 1994: 571–627.

Gospodarowicz D, Papkoff H. A simple method for the isolation of pregnant mare serum gonadotropin. Endocrinology 1967;80: 699-702.

Goudet G, Belin F, Bezard J, Gerard N. Intrafollicular content of luteinizing hormone receptor, {alpha}-inhibin, and aromatase in relation to follicular growth, estrous cycle stage, and oocyte competence for *in vitro* maturation in the mare. Biol Reprod 1999; 60: 1120-1127.

Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. Endocr Rev 1996; 17:121–155.

Guillaume D, Bruneau B, Briant C. Comparison of the effects of two GnRH antagonists on LH and FSH secretion, follicular growth and ovulation in the mare. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42: 251–264.

Guillou F, Combarnous Y. Purification of equine gonadotropins and comparative study of their acid-dissociation and receptor-binding specificity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1983; 755: 229-236.

Guthrie HD, Barber JA, Leighton JK, Hammond JM. Steroidogenic cytochrome P450 enzyme messenger ribonucleic acids and follicular fluid steroids in individual follicles during preovulatory maturation in the pig. *Biol Reprod* 1994; 51: 465–471.

Hall JE, Bhatta N, Adams JM, Rivier JE, Vale WW, Crowlwy WF Jr. Variable tolerance of the developing follicle and corpus luteum to gonadotropin-releasing hormone antagonist-induced gonadotropin withdrawal in the human. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 993-1000.

Hillier SG. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum Reprod* 1994; 9:188–191.

Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991; 124: 43-101.

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

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

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

Karnitis VJ, Townson DH, Friedman CI, Danforth DR. Recombinant human follicle-stimulating hormone stimulates multiple follicular growth, but minimal estrogen production in gonadotropin-releasing hormone antagonist-treated monkeys: examining the role of luteinizing hormone in follicular development and steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metabol* 1994; 79: 91–97.

Karten MJ, Rivier JE. Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: Rationale and perspective. *Endocrinology* 1986; 7: 44-66.

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.

Lahlou N, Delivet S, Bardin CW, Roger M, Spitz IM, Bouchard P. Changes in gonadotropin and alpha-subunit secretion after a single administration of gonadotropin-releasing hormone antagonist in adult males. *Fertil Steril* 1990; 53: 898-905.

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

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

Lofsted RM. Termination of unwanted pregnancy in the mare. In: Morrow DA. *Current Therapy in Theriogenology*. 2nd ed. WB Saunders Company, 1986; 715-718.

Maclellan LJ, Whyte TR, Murray A, Fitzpatrick LA, Earl CR, Aspden JE, *et al.* Superstimulation of ovarian follicular growth with FSH, oocyte recovery, and embryo production from zebu (*Bos indicus*) calves: effects of treatment with a GnRH agonist or antagonist. *Theriogenology* 1998; 49: 1317–1329.

McCue P. Diagnóstico de patologías Ováricas. In: Recent Advances in Equine Reproduction. BA. Ball (Ed). 2000. Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA.

Manning AW, Rajkumar K, Bristol F, Flodd PF, Murphy BD. Genetic and temporal variation in serum concentrations and biological activity of horse chorionic gonadotropin. J Reprod Fertil Suppl 1987; 35: 389-397.

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.

Matikainen T, Ding YQ, Vergara M, Huhtaniemi I, Couzinet B, Schaison G. Differing responses of plasma bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone to gonadotropin-releasing hormone antagonist and agonist treatments in postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab 1992; 75: 820-825.

Meenakshi VG, Gupta AK, Garg SK. Determination of gestation period of mare with maximum eCG concentration by bioassay. Indian J Anim Res 2006; 40: 25-29.

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

Moore WT Jr, Ward DN. Pregnant mare serum gonadotropin: an in vitro characterization of the luteotropin-follicle-stimulating hormone dual activity. J Biol Chem 1980; 255: 6930-6936.

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

Munro C, Stabefeldt G. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. J Endocrinol 1984; 101:41-49.

Nelson LR, Fujimoto VY, Jaffe RB, Monroe SE. Suppression of follicular phase pituitary-gonadal function by a potent new gonadotropin-releasing hormone antagonist with reduced histamine-releasing properties (ganirelix). *Fertil Steril* 1995; 63:963–969.

Nett TM, Holtan DW, Estergreen VL. Oestrogens, LH, PMSG and prolactin in serum of pregnant mares. *J Reprod Fertil Suppl* 1975; 23: 457- 462.

Nilsson EE, Skinner MK. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol Reprod* 2002; 67: 1018-1024.

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

Oussaid B, Mariana JC, Poulin N, Fontaine J, Lonergan P, *et al.* Reduction of the developmental competence of sheep oocytes by inhibition of LH pulses during the follicular phase with a GnRH antagonist. *J Reprod Fertil* 1999; 117: 71–77.

Oussaid B, Lonergan P, Khatir H, Guler A, Monniaux D, Touze JL, *et al.* Effect of GnRH antagonist-induced prolonged follicular phase on follicular atresia and oocyte developmental competence *in vitro* in superovulated heifers. *J Reprod Fertil* 2000; 118: 137–144.

Padmanabhan V, McNeilly AS. Is there an FSH-releasing factor?. *Reproduction* 2001; 121: 21-30.

Palmer E, Quellier P. Uses of LHRH and analogues in the mare. *Proc 11th Int. Congr. Anim. Reprod AI Dublin, Ireland* 1988;5: 339-346.

Palmer E. [Effect of GnRH antagonist (ORG 30583) on ovarian activity of the cyclic mare]French. Effet d'un antagoniste de GnRH (ORG 30583) sur l'activité ovarienne cyclique de la jument. *Colloque Société Française d'Études sur la Fertilité* 1988; 26: 311–320.

Papkoff H, Farmer SW, Cole HH. Isolation of a gonadotropin (PMEG) from pregnant mare endometrial cups: comparisons with PMSG. *Proc Soc Exp Biol Med* 1978a; 158: 373-377.

Papkoff H, Bewley TA, Ramachandran J. Physicochemical and biological characterization of pregnant mare serum gonadotropin and its subunits. *Biochimica et Biophysica Acta* 1978b; 532:185-194.

Pierce JG, Parsons TF. Glycoproteins hormones: structures and function. *Annu Rev Biochem* 1981; 50: 465-495.

Pierson RA. Folliculogenesis and ovulation. In: McKinnon AO, Voss JL, editors. *Equine Reproduction*, Philadelphia: Lea and Febiger, 1993: 161-173.

Pinsky J, Lamharzi N, Halmos G, Groot K, Jungwirth A, Vadillo-Buenfil M, *et al.* Chronic administration of the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) antagonist cetrorelix decreases gonadotrope responsiveness and pituitary LHRH receptor messenger ribonucleic acid levels in rats. *Endocrinology* 1996; 137:3430–3436.

Reissmann T, Felberbaum R, Diedrich K, Engel J, Comaru-Schally AM, Schally AV. Development and applications of luteinizing hormone-releasing hormone antagonists in the treatment of infertility: an overview. *Hum Reprod* 1995; 10:1974-1981.

Reissman T, Schally AV, Bouchard P, Riethmüller H, Engel J. The LHRH antagonist cetrorelix: a review. *Hum Reprod* 2000; 6: 322-331.

Rivera GM, Fortune JE. Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF)- binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein A contributes to proteolysis of IGF-binding protein 5 in bovine follicular fluid. *Endocrinology* 2003; 144: 437-446.

Roser JF, Lofsted RM. Urinary eCG patterns in the mare during pregnancy. *Theriogenology* 1989; 32: 607-622.

Roser JF. Equine Chorionic Gonadotropin. In: Knobil E, Neil D, editors. *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press. 1999: 29-37.

Saint-Dizier M, Chopineau 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; 69: 1743-1749.

Sanderson JT. The steroid hormone biosynthesis pathways as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicol Sci* 2006; 94: 3-21.

Schams D, Berisha B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Dome Anim Endocrinol* 2002; 23: 53-65.

Sirois J, Ball BA, Fortune JE. Patterns of growth and regression of ovarian follicles during the oestrus cycle and after hemiovariectomy in mares. *Eq Vet J* 1989; 21:43-48.

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

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

Squires EL, Douglas RH, Steffenhagen WP, Ginther OJ. Ovarian changes during the estrous cycle and pregnancy in mares. *J Anim. Sci.* 1974a; 38: 330-338.

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

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

Squires EL, Ginther OJ. Follicular and luteal development in pregnant mares. J Reprod Fertil 1975; 23 Suppl: 429-433.

Stewart F, Allen WR. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotropins. J Reprod Fertil 1981; 62: 527-536.

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

Taylor PD, Hillier SG, Fraser HM. Effects of GnRH antagonist treatment on follicular development and angiogenesis in the primate ovary. J Endocrinol 2004; 183: 1-17.

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

Thway TM, Clay CM, Maher JK, Reed DK, McDowell KJ, Antczack DF, *et al.* Immortalization of equine trophoblast cell lines of chorionic girdle cell lineage by simian virus-40 large T antigen. J Endocrinol 2001; 171: 45-55.

Tian XC, Berndtson AK, Fortune JE. Differentiation of bovine preovulatory follicles during the follicular phase is associated with increases in messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 side-chain cleavage, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, and P450 17 α -hydroxylase, but not P450 aromatase. Endocrinology 1995; 136: 5102–5110.

Urias CCJ. Papel de la gonadotropinas coriónica equina en la estimulación de la esteroidogénesis durante la gestación equina. (Tesis de Maestría) México DF: FMVZ - UNAM, 2008.

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

Van VBJ. Follicular development. In: Knobil E, Neil D, editors. *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, 1999: 376-389.

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

Ward DN, Moore WT Jr, Burleigh BD. Structural studies on equine chorionic gonadotropin. *J Protein Chem* 1982; 1: 263-280.

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

Watson ED, Thomassen R, Steele M, Heald M, Leask R, Groome NP, *et al.* Concentrations of inhibin, progesterone, and oestradiol in fluid from dominant and subordinate follicles from mares during spring transition and the breeding season. *Anim Reprod Sci* 2002; 74: 55–67.

Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA, Armstrong DG. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reprod Suppl* 2003; 61: 71-90.

Wooding FB, Morgan G, Fowden AL, Allen WR. A structural and Immunological study of chorionic gonadotrophin production by equine trophoblast girdle and cup cells. *Placenta* 2001; 22: 749-767.