



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**EFFECTO DE UN ANTAGONISTA DE GnRH SOBRE LA
FUNCIÓN LÚTEA Y LA VIABILIDAD FETAL EN
GESTACIONES EQUINAS Y MULARES**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

FERNANDO CALDERÓN LÓPEZ

TUTOR

DRA. ANA MYRIAM BOETA ACOSTA

COMITÉ TUTORAL:

PhD. LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO

PhD. JUAN SALAZAR ORTIZ

MÉXICO, D.F.

2012



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.

Fernando Calderón López

DEDICATORIAS

A mi esposa Marycarmen

Chiquilla creo que soy el hombre mas afortunado del mundo al tenerte a mi lado tu eres simplemente la mujer que complementa mi vida y lo mejor que me ha pasado, gracias por aguantar mis defectos pero también gracias por jalarme las orejas cada que es necesario aunque no me parezca en el momento se que lo haces para que sea una mejor persona y lo mas importante gracias por darme a nuestro bodoquito alias el CHOCO tan perfecto como el que tenemos. TE AMO.

Fer junior

Hijo me siento tan feliz por ser tu padre, hago y haré lo posible para no decepcionarte, el ser padre es una tarea muy difícil que decidimos aceptar tu mama y yo y que aunque estamos muy nuevos y sonsos por ahora todos los días nos enseñan cosas nuevas porque mi deseo es que seas feliz y crezcas sano para ser un hombre de bien como cualquier padre lo desea.

A mis papas

Les agradezco el apoyo incondicional que me han brindado toda la vida sin importar los problemas que tienen día a día siempre tienen como prioridad a sus hijos y agradezco a dios por tener a los mejores padres que un hijo pueda tener.

A mis hermanos

Gracias Frank, Yareli y Vere por que indudablemente no pude tener mejor ejemplo que ustedes que aunque de niños siempre nos dábamos duro el tenerlos me hace sentir muy feliz y seguro de mi mismo porque se que siempre en las malas y buenas estaremos juntos.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, Institución educativa a la cual le debo mi formación educativa de posgrados.

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

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)

A la Dra. Myriam por sus enseñanzas y por darnos la libertad y confianza para la realización de este proyecto.

A Luis Zarco, quien realmente me hecho la mano a pesar de su ocupada agenda.

Al Dr. Juan Zalazar por sus recomendaciones y comprensión.

A Anita Rodriguez por su enorme apoyo en el laboratorio para la obtención de resultados hormonales y que siempre tiene un carácter agradable y nos da un trato muy padre a todos nosotros.

Al Dr. Carlos Gutiérrez por su ayuda para mejorar, afinar y realizar un mejor trabajo.

A Clarita que estoy muy seguro va a estar contenta por titularme de tanta lata que le di pero que siempre me estuvo empujando y animando para terminar mi tesis.

A todas aquellas personas con las que compartimos preocupaciones, enojos, traspasadas de hambre, y que todos los días me alimentaban con la comida que llevaban al rancho (mmm la excelente comida de la chef hermana de Marianita), pero también los buenos momentos en el rancho, en la combi, en el metro, los viernes jeje para: Heli, Erika, Daniel, Alain, Marianita radioactiva, Jimena, Erick, Luis, Adriana, a los polis del rancho a clito (el único gato que me ha caído bien hasta ahora y si alguien sabe de su paradero hay avisan) y a las personas que nos confiaron sus yeguas que claro sin ellos no hubiera sido posible la realización de este trabajo y que para mis amigos siempre tendrán mi mano y mi amistad y que cuando vengan a Michoacán serán bienvenidos.

RESUMEN

Efecto de un antagonista de GnRH sobre la función lútea y la viabilidad fetal en gestaciones equinas y mulares.

Con el objeto de diferenciar los efectos de la LH y la eCG durante la gestación equina se comparó la incidencia de ovulaciones secundarias, formación de cuerpos lúteos accesorios, concentraciones de progesterona y pérdidas de gestación en yeguas con concentraciones normales de eCG y LH (yeguas testigo servidas con caballo), yeguas con concentraciones normales de eCG pero deficientes en LH (yeguas servidas con caballo tratadas con un antagonista de GnRH), yeguas con concentraciones normales de LH pero deficientes en eCG (yeguas testigo servidas con burro), y yeguas deficientes tanto en eCG como en LH (yeguas servidas con burro tratadas con un antagonista de GnRH). Se encontró que en las yeguas con gestación equina tratadas con antarelix se redujo la incidencia de ovulaciones secundarias pero se formó un número elevado de folículos hemorrágicos anovulatorios que posteriormente se transformaron en cuerpos lúteos accesorios de gran tamaño y con gran capacidad de producción de progesterona. En contraste, en las yeguas con gestación mular tratadas con antarelix solamente un animal tuvo una ovulación secundaria y se suprimió totalmente la formación de cuerpos lúteos accesorios, lo que resultó en concentraciones de progesterona significativamente menores ($p < 0.05$) a las encontradas en el resto de los grupos. Como resultado, 5 de las 8 yeguas con gestación mular tratadas con antarelix perdieron la gestación, mientras que en el resto de los grupos no ocurrieron abortos. El análisis individual de las concentraciones hormonales muestra que las yeguas con gestación mular tratadas con antarelix que mantuvieron la gestación tenían concentraciones más elevadas de eCG que las normalmente presentes en gestaciones mulares. Se concluye que la presencia de eCG durante la gestación de la yegua estimula el desarrollo folicular, permite la luteinización gradual de folículos desarrollados y tiene efectos luteotrópicos sobre cuerpos lúteos accesorios. En ausencia de LH se requiere un umbral mínimo de secreción de eCG para mantener una función lútea adecuada, por debajo del cual la gestación está en riesgo. Por otra parte, se requiere LH o concentraciones muy altas de eCG para que se produzca la ovulación secundaria que normalmente se produce entre la semana 5 y 7 de la gestación, y la secreción de LH parece ser indispensable para que en etapas posteriores se produzcan ovulaciones o una rápida luteinización de folículos dominantes. En resumen, es necesaria la presencia de ambas hormonas para que se produzca el patrón de desarrollo folicular, ovulaciones secundarias y formación rápida de cuerpos lúteos accesorios a partir de folículos dominantes que caracteriza las gestaciones equinas normales, por lo que los efectos de la LH y la eCG, aunque muestran un cierto grado de redundancia, son también lo suficientemente distintos para ser considerados como complementarios.

Palabras clave: antagonista de GnRH, eCG, LH, cuerpos lúteos, gestación equina, gestación mular.

ABSTRACT

Effect of GnRH antagonist about the luteal function and fetal viability in equine and mule gestation.

With the purpose of differentiate the LH and equine eCG effects during gestation compared the incidence of secondary ovulation, accesories corpus luteum formation and progesterone concentrations in pregnant mares losses with normal concentrations of eCG and LH (control mares served with horse), mares with normal eCG, but LH deficient (mares treated with GnRH antagonist served with horse), mares with normal LH but eCG deficient (control mares served with donkey), and therefore eCG and LH deficient mares (mares treated with a GnRH antagonist served with donkey). We found that in mares carrying equine conceptus and treated with antarelix decreased secondary ovulations but formed a large number of hemorrhagic anovulatory follicles that subsequently became in accessory corpus luteum with a high progesterone production. In contrast with mares carrying mule conceptus treated with antarelix where just one mare has a secondary ovulation and completely suppressed the formation of accessory corpora lutea in all animals of this group, resulting in significantly lower progesterone concentrations ($p < 0.05$) than those found in the rest of the groups. As a result, 5 of 8 pregnant mares carrying mule conceptus treated with antarelix lost gestation, while in the remaining groups did not occur abortions. Hormone levels show that mares carrying mule conceptus treated with antarelix the eCG was higher in mares did not abort than in mares with lost gestation. This concentrations of eCG was higher than normally present in mule pregnancies. We conclude that eCG in pregnant mares stimulate follicular development, allows luteinization on developed follicles and has luteotropic effects on accesories corpus luteum. In LH absence is required minimum threshold eCG secretion to maintain adequate luteal function, below which is at risk pregnancy.

Furthermore, LH is required or very high eCG concentrations to produce secondary ovulation typically occurs between 5 and 7 weeks of gestation, LH secretion appears to be essential to occur in later stages ovulations or fast luteinization of dominant follicles. In short, requires the presence of both hormones to produce the follicular development pattern, secondary ovulation and quick formation of corpora lutea accesories from dominant follicles which normal characterizes of equine pregnancies, so that the effects of LH-eCG show a certain degree of redundancy are also sufficiently different to be complementary.

Keywords: GnRH antagonist, eCG, LH, corpus luteum, equine pregnancy, mule pregnancy.

CONTENIDO

RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	3
3. OBJETIVOS.....	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
4.1 Endocrinología reproductiva de la yegua.....	4
4.1.1 Hipotálamo.....	4
4.1.2 Adenohipófisis.....	4
4.1.3 Estructura y función de GnRH.....	6
4.1.4 Regulación de la secreción de GnRH.....	7
4.2 AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE GNRH.....	9
4.2.1 Análogos de la GnRH.....	9
4.2.2 Antagonistas de GnRH.....	9
4.2.3 Efecto diferencial de los antagonistas de GnRH sobre la secreción de LH y FSH.....	11
4.2.4 Efectos del antagonista de GnRH en equinos.....	12
4.3 FISIOLÓGÍA DE LA GESTACIÓN EQUINA.....	13
4.3.1 Tránsito oviductual.....	13
4.3.2 Reconocimiento materno de la gestación.....	14
4.3.3 Formación de las membranas fetales.....	15
4.3.4 Hormona luteinizante (LH).....	17
4.3.5 Hormona folículo estimulante (FSH).....	17
4.3.6 Resurgencia del cuerpo lúteo primario.....	18
4.3.7 Cuerpos lúteos secundarios y accesorios.....	19
4.3.8 Folículos hemorrágicos anovulatorios (FHAs).....	20
4.3.9 Progesterona lútea.....	22
4.3.10 Importancia de la progesterona durante la gestación.....	23
4.3.11 Copas endometriales.....	24

4.3.12 Gonadotropina coriónica equina.....	28
4.3.13 Papel de la eCG y la LH en la gestación equina y en la gestación mular.....	32
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
5.1 Localización.....	36
5.2 Animales.....	36
5.3 Tratamiento con antarelix.....	37
5.4 Variables evaluadas.....	37
5.5 Análisis estadístico.....	38
6. RESULTADOS.....	41
6.1 Pérdidas gestacionales.....	41
6.2 Incidencia de cuerpos lúteos secundarios y/o accesorios.....	41
6.3 Concentraciones de gonadotropina coriónica equina.....	42
6.4 Concentraciones de progesterona.....	44
6.5 Diámetro de cuerpos lúteos primarios.....	47
6.6 Diámetro de los cuerpos lúteos secundarios.....	48
6.7 Cuerpos lúteos accesorios formados a partir de folículos hemorrágicos anovulatorios.....	49
7. DISCUSION.....	51
7.1 Concentraciones de eCG.....	51
7.2 Pérdidas de la gestación y su relación con las concentraciones hormonales.....	52
7.3 Ovulaciones durante la gestación y formación de cuerpos lúteos secundarios.....	55
7.4 Cuerpos lúteos accesorios y concentraciones de progesterona.....	57
8. CONCLUSIONES.....	60
9. ANEXO.....	62
9.1 Descripción de los casos de yeguas con gestación mular tratadas con antarelix que perdieron la gestación	62
9.2 Descripción de los casos de yeguas con gestación mular tratadas con antarelix que no perdieron la gestación.....	69
9.3 Descripción de los casos de yeguas con gestaciones equinas tratadas con antarelix.....	74
10. LITERATURA CITADA.....	92

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama que muestra las actividades llevadas a cabo durante el trabajo de campo en ambos grupos de animales. IA= Inseminación Artificial; Dx gx= Diagnóstico de gestación; n= número de animales; IV= Intravenosa; IM= Intramuscular.....40

Figura 2. Concentraciones de eCG en yeguas con gestación equina o mular tratadas (antarelix) o no (testigo) con un antagonista de GnRH a razón de 0.01mg/Kg/día. Las concentraciones promedio de eCG de los grupos con gestación equina fueron significativamente mayores que las de los grupos con gestación mular ($p<0.01$). La barra sólida horizontal indica el periodo de administración de antarelix a los grupos experimentales.....43

Figura 3. Concentraciones de eCG en yeguas con gestación mular que abortaron o que no abortaron al ser tratadas con antarelix a razón de 0.01mg/kg/día, utilizando como referencia al grupo de yeguas testigo (no tratadas) con gestación mular. Las concentraciones promedio de eCG de las yeguas que no abortaron fueron significativamente mayores a los de las yeguas testigo ($p<0.05$) y a los de las yeguas que si abortaron ($p<0.05$). A partir de la semana 7 las concentraciones de eCG fueron significativamente menores en las yeguas tratadas que no abortaron que en las yeguas testigo. La barra sólida horizontal indica el periodo de administración de antarelix a los grupos experimentales.....44

Figura 4. Concentraciones de progesterona en yeguas con gestación equina o mular tratadas (antarelix) o no (testigo) con un antagonista de GnRH a razón de 0.01mg/kg/día. Las concentraciones promedio de progesterona de cada grupo durante el estudio fueron significativamente diferentes a las de cualquier otro grupo ($p<0.05$). La barra sólida horizontal indica el periodo de administración de antarelix a los grupos experimentales....45

Figura 5. Concentraciones de progesterona en yeguas con gestación mular que abortaron o que no abortaron al ser tratadas con antarelix a razón de 0.01mg/kg/día, utilizando como

referencia al grupo de yeguas testigo (no tratadas) con gestación mular. Las concentraciones promedio de progesterona de las yeguas que abortaron fueron significativamente menores que los de las yeguas que no abortaron (ambas de grupo antarelix) y que los de las yeguas testigo con el mismo tipo de embrión ($p < 0.01$). Las diferencias entre las yeguas tratadas que no abortaron y las yeguas testigo no son significativas ($p > 0.05$).....46

Figura 6. Diámetro del cuerpo lúteo primario en yeguas con gestación equina y mular tratadas (antarelix) o no (testigo) con un antagonista de GnRH a razón de 0.01mg/kg/día. Los diámetros promedio del grupo antarelix con gestación mular fueron significativamente diferentes a los de los otros tres grupos ($p < 0.05$). Los diámetros promedio del grupo antarelix con gestación equina fueron significativamente diferentes a los de los grupos testigo después de la semana 13 ($p < 0.05$). La barra sólida horizontal indica el periodo de administración de antarelix.....47

Figura 7. Diámetro de los cuerpos lúteos secundarios en yeguas con gestación equina y mular tratadas o no con antarelix a razón de .01 mg/kg/día. La barra sólida horizontal indica el periodo de administración de antarelix a los grupos experimentales.....48

Figura 8. Volumen total de folículos hemorrágicos anovulatorios en yeguas con gestación equina tratadas o no con un antagonista de GnRH a razón de 0.01mg/kg/día. El área sombreada representa el periodo de administración de antarelix en los grupos experimentales. El volumen promedio de los FHAs de las yeguas experimentales con gestación equina fue significativamente mayor al de los otros grupos ($p < 0.05$).....50

Figura 9. Volumen total de folículos hemorrágicos anovulatorios en yeguas con gestación mular tratadas o no con un antagonista de GnRH a razón de 0.01mg/kg/día. El área sombreada representa el periodo de administración de antarelix en los grupos experimentales.....50

Figura 10. Concentraciones de progesterona, eCG y diámetro del cuerpo lúteo primario en una yegua con gestación mular que sufrió mortalidad fetal por aparente deficiencia lútea primaria. Las flechas indican el momento en que se registró la muerte fetal. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.....63

Figura 11. Concentraciones de progesterona, eCG y diámetro del cuerpo lúteo primario en una gestación mular que sufrió muerte fetal por deficiencia lútea secundaria. Las flechas indican el momento en que se registró la muerte fetal. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.....65

Figura 12. Concentraciones de progesterona, eCG y diámetro del cuerpo lúteo primario en una yegua con gestación mular tratada con antarelix que sufrió muerte fetal por insuficiencia lútea secundaria (falta de apoyo gonadotrópico) en la semana 10 de gestación. Las flechas indican el momento en que se registró la muerte fetal. La zona sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.....66

Figura 13. Concentraciones de progesterona, eCG y diámetro del cuerpo lúteo primario en una yegua con gestación mular tratada con antarelix que sufrió mortalidad fetal por deficiencia lútea secundaria. Las flechas indican el momento en que se registró la muerte fetal. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.....67

Figura 14. Concentraciones de progesterona, eCG y diámetro del cuerpo lúteo primario en una yegua con gestación mular tratada con antarelix que sufrió mortalidad fetal por deficiencia lútea debida a luteólisis activa. Las flechas indican el momento en que se registró la muerte fetal. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.....69

Figura 15. Concentraciones de progesterona, eCG, diámetro del cuerpo lúteo primario y secundario en una yegua con gestación mular que mantuvo la gestación a pesar de haber

sido tratada con antarelix. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.....71

Figura 16. Concentraciones de progesterona, eCG y diámetro de cuerpo lúteo primario en una yegua con gestación mular que mantuvo la gestación a pesar de haber sido tratada con antarelix. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.....72

Figura 17. Concentraciones de progesterona, eCG y diámetro de cuerpo lúteo primario en una gestación mular que mantuvo la gestación. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.....74

Figura 18. Concentraciones de progesterona y eCG, diámetro del cuerpo lúteo primario, cuerpo lúteo secundario y volumen de FHAs en una yegua con gestación equina tratada con antarelix. Los óvalos indican el momento en el que se detectó por primera vez cada FHAs. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.....76

Figura 19. Concentraciones de progesterona, eCG, diámetro de cuerpo lúteo primario y volumen de glándulas lúteas accesorias en una yegua con gestación equina tratada con antarelix. Los óvalos indican el momento en el que se detectó por primera vez cada cuerpo lúteo accesorio. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.....78

Figura 20. Concentraciones de progesterona y eCG, diámetro de cuerpo lúteo primario y volumen de FHAs en una yegua con gestación equina tratada con antarelix. Los óvalos indican el momento en el que se detectó por primera vez cada cuerpo lúteo accesorio. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.....80

Figura 21. Concentraciones de progesterona, eCG y diámetro de cuerpo lúteo primario en una gestación equina tratada con antarelix. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.....81

Figura 22. Concentraciones de progesterona, eCG y diámetro de cuerpo lúteo primario en una gestación equina tratada con antarelix. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.....83

Figura 23. Concentraciones de progesterona, eCG, diámetro de cuerpo lúteo primario, cuerpo lúteo secundario y volumen de FHAs en una gestación equina tratada con antarelix. Los óvalos indican el momento en el que se detectó por primera vez cada cuerpo lúteo accesorio. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.....85

Figura 24. Concentraciones de progesterona, eCG, diámetro de cuerpo lúteo primario y volumen de FHAs en una gestación equina tratada con antarelix. Los óvalos indican el momento en que se detectó por primera vez cada cuerpo lúteo accesorio. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.....87

Figura 25. Concentraciones de progesterona, eCG, diámetro de cuerpo lúteo primario y volumen de FHAs en una gestación equina tratada con antarelix. Los óvalos indican el momento en el que se detectó por primera vez cada cuerpo lúteo accesorio. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.....89

Figura 26. Concentraciones de progesterona, eCG, diámetro de cuerpo lúteo primario y volumen de FHAs en una gestación equina tratada con antarelix. Los óvalos indican el momento en el que se detectó por primera vez cada cuerpo lúteo accesorio. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.....91

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Porcentajes de pérdidas fetales y presencia de cuerpos lúteos secundarios y accesorios en los dos tipos de gestación.....	42
--	----

EFECTO DE UN ANTAGONISTA DE GNRH SOBRE LA FUNCIÓN LÚTEA Y LA VIABILIDAD FETAL EN GESTACIONES EQUINAS Y MULARES

1. INTRODUCCIÓN

En el equino, la LH secretada por la hipófisis anterior es fundamental para el desarrollo y funcionamiento normal del cuerpo lúteo primario durante los primeros 35 días de gestación, antes de que comience la secreción de gonadotropina coriónica equina (eCG). Durante este periodo inicial de la gestación la secreción de FSH continúa estimulando la ocurrencia de oleadas foliculares, lo que resulta en el desarrollo periódico de folículos dominantes que no llegan a ovular (Miller et al., 1980; Gigli et al., 2006). No obstante alrededor del día 40 de la gestación comienzan a ocurrir ovulaciones secundarias y/o la formación de cuerpos lúteos suplementarios, lo que se ha asumido es debido a la estimulación ejercida por la gonadotropina coriónica equina (eCG) producida por las copas endometriales, que comienzan a elevarse a partir del día 38 de la gestación (Ginther, 1992; Squires et al., 1974; Murphy y Martinuk, 1991).

En gestaciones equinas las máximas concentraciones de eCG se alcanzan alrededor del día 65 de la gestación, desapareciendo de la circulación entre el día 120-150 debido al rechazo inmunológico de las copas endometriales por el sistema inmune de la madre (Allen, 1984; Allen y Stewart, 2003; Murphy y Martinuk, 1991). En el caso de las gestaciones mulares (yeguas preñadas por burros) existe un rechazo inmunológico prematuro de las copas endometriales (Allen, 1975; 1982; 2001), por lo que la eCG regresa a niveles basales desde 50 de la gestación o antes, hasta desaparecer por completo de la circulación en el día 80-90 de la gestación (Boeta y Zarco, 2005; 2010; 2012). Esta falta de apoyo gonadotrópico provoca que se formen pocos cuerpos lúteos suplementarios (cuerpos lúteos secundarios o accesorios) y que después del día 40 de la gestación las concentraciones de progesterona se mantengan muy por debajo de las encontradas durante una gestación de yegua servida con caballo (Bergfelt et al., 1989; Allen et al., 1997; Allen, 2001; Boeta y Zarco, 2012). A pesar de lo anterior, se ha demostrado que la gestación puede ser mantenida por varias

semanas y aún continuar hasta su término sin la presencia de eCG y sin el desarrollo de cuerpos lúteos suplementarios (Allen, 2001; Allen y Stewart, 1993), lo que genera una interrogante sobre el papel de la eCG durante la gestación equina, ya que al parecer esta puede mantenerse solamente con la estimulación lútea provocada por la presencia de gonadotropinas hipofisiarias.

Los antagonistas de GnRH han sido utilizados en diversas especies para estudiar el papel de las gonadotropinas hipofisiarias sobre el desarrollo folicular y la ovulación (Halmos et al, 1996; 2002; Duijkerts et al, 1998; Guillaume et al, 2002; Briant et al, 2003). En estudios realizados en yeguas vacías se ha demostrado que la administración de Antarelix, un antagonista de GnRH, interrumpe y bloquea totalmente las oleadas preovulatorias de LH hasta por 13 días (Briant et al., 2003). Con este antagonista la LH se suprime mucho más rápido e intensamente que la FSH (Guillaume et al, 2002; Briant et al, 2003) debido a que la FSH es menos dependiente de la secreción de GnRH (Schwartz, 1983; Schwartz et al, 1985; Becker y Johnson, 1992; Briant et al., 2003). Además de ser un potente inhibidor de la LH durante la fase folicular en yeguas y en otras especies domésticas, el antarelix no presenta efectos secundarios ni impide la secreción de gonadotropinas o el desarrollo de cuerpos lúteos después de que deja de ser administrado (Briant et al., 2003).

El hecho que en muchas gestaciones mulares se mantenga una función lútea suficiente para mantener la gestación a pesar de existir una carencia natural de eCG (Boeta et al, 2005; 2012), sugiere que en este tipo de gestaciones la LH de origen hipofisiario podría ser responsable, o por lo menos colaborar, en la formación y mantenimiento de las glándulas lúteas suplementarias. Esta posibilidad podría evaluarse mediante la administración de un antagonista de GnRH a yeguas con deficiente secreción de eCG (con gestación mular), en las que la ausencia simultánea de eCG y LH podría provocar una deficiencia lútea y la muerte fetal. En cambio, la administración de antarelix a yeguas con gestación equina resultará en animales sin LH pero con eCG, lo que permitirá evaluar el papel de la eCG durante la gestación.

2. HIPOTESIS

La administración de un antagonista de GnRH provocará el cese de la actividad lútea y evitará la formación de nuevas estructuras lúteas en gestaciones con deficiencia de eCG, afectando la viabilidad fetal, mientras que en las gestaciones con concentraciones altas de eCG continuará la actividad lútea y se mantendrá la viabilidad fetal.

3. OBJETIVOS

- 1.- Diferenciar la función luteotrófica y luteogénica de la eCG y la LH durante la gestación de la yegua.
- 2.- Evaluar la función del cuerpo lúteo primario, la formación de cuerpos lúteos secundarios y/o accesorios y la viabilidad fetal durante el tratamiento con un antagonista de GnRH en gestaciones equinas y gestaciones mulares.
- 3.- Medir las concentraciones séricas de P4 y eCG antes, durante y después del tratamiento con el antagonista de GnRH y relacionarlas con la formación de cuerpos lúteos suplementarios en los dos tipos de gestaciones.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 ENDOCRINOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LA YEGUA

4.1.1 Hipotálamo

Está localizado por encima de la base del cráneo, alrededor del tercer ventrículo. Su límite anterior es el quiasma óptico y su límite posterior está definido por los cuerpos mamilares. Lateralmente está separado de los lóbulos temporales por los surcos hipotalámicos. En el área preóptica del hipotálamo y en el hipotálamo medio-basal se localizan las neuronas que secretan uno de los neuropéptidos más importantes de la reproducción, la GnRH. Los axones de estas células se proyectan al espacio perivascular de la eminencia media, donde liberan pulsos de GnRH hacia el sistema porta-hipotalámico-hipofisiario, el cual transporta la hormona hacia la hipófisis anterior (Ginther, 1992).

4.1.2 Adenohipófisis

La adenohipófisis (hipófisis anterior) está suspendida debajo del hipotálamo por el infundibulum y se aloja en la silla turca, un hueco en el hueso esfenoides del piso del cráneo. Está conectada al hipotálamo por el tallo pituitario que rodea a la eminencia media. El hipotálamo y la hipófisis interactúan para dirigir la secreción de muchas hormonas diferentes. Entre la adenohipófisis y el hipotálamo existe una vía directa de comunicación vascular, el sistema porta hipotálamo-hipofisiario. Las neurohormonas liberadas en la eminencia media por las neuronas hipotalámicas ingresan a los capilares hipotalámicos del sistema porta hipotálamo-hipofisiario, y salen de los capilares del mismo sistema en la adenohipófisis, donde actúan sobre las células blanco para estimular o inhibir la liberación de hormonas específicas (Ginther, 1992)

Los gonadotropos son las células productoras de LH y FSH en la adenohipófisis. Son las células blanco del GnRH y se caracterizan por contener grandes cantidades de retículo

endoplásmico rugoso y aparato de Golgi para la síntesis y glicosilación de glicoproteínas. (Becker y Johnson, 1992; Ginther, 1992).

Los gonadotropos tienen receptores específicos para GnRH (Halmos et al, 2002), los cuales son del tipo de receptores transmembranales acoplados a proteína G. Cuando la GnRH se une a su receptor, la proteína G α sufre cambios que resultan en la activación de la enzima fosfolipasa C. Esta enzima actúa sobre fosfolípidos de la membrana, liberando fosfatidilinositol-trifosfato (IP $_3$) hacia el citoplasma y dejando diacil-glicerol embebido en la membrana. El IP $_3$ actúa sobre canales iónicos en el retículo endoplásmico, permitiendo el flujo de Ca $^{+2}$ hacia el citoplasma. El calcio se une a diversas proteínas, provocando cambios en su conformación que resultan en activación o inactivación. Por su parte, el diacilglicerol que permanece en la membrana activa a la enzima proteína-kinasa C, que fosforila a diversas proteínas, cambiando su conformación y su función (Millar, 2005). Como resultado de todos estos cambios se activan varias familias de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) se estimula síntesis y/o secreción de hormonas gonadotrópicas (Pawson and McNeilly, 2005). A través de los efectos de distintas MAPK el GnRH logra estimular la expresión de los genes de la subunidad α de las gonadotropinas, de la subunidad β de LH o de la subunidad β de FSH (Pawson y MacNeilly, 2005). El GnRH también estimula la expresión del gen para el receptor de GnRH en los gonadotropos, pero la estimulación crónica con GnRH resulta en la desensibilización de los gonadotropos, que dejan de responder al GnRH (Pawson y McNeilly, 2005).

Mientras la LH o la FSH están siendo sintetizadas en el retículo endoplásmico, se les añade un polisacárido precursor en ciertos aminoácidos específicos. Posteriormente la hormona es transportada en vesículas hacia el aparato de Golgi, donde el carbohidrato precursor va sufriendo modificaciones mediante el recorte y adición de carbohidratos específicos, hasta llegar a su composición final (Gigli et al., 2006).

Cuando son estimulados por la GnRH, los gonadotropos liberan sus hormonas (LH o FSH), lo que es controlado por la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH. Las

hormonas secretadas entran a la circulación sistémica y al llegar al ovario, la FSH estimula el reclutamiento folicular mientras que la LH es responsable de madurar el folículo y causar la ovulación, así como de luteinizar al cuerpo lúteo (Ginther, 1992).

4.1.3 Estructura y función de GnRH

En diversas especies de vertebrados se han identificado por lo menos 23 variantes de GnRH, los cuales se pueden dividir en dos clases básicas. El GnRH I es la hormona producida en el hipotálamo para regular la secreción de gonadotropinas, mientras que el GnRH II es producido en diversos tejidos y puede tener múltiples funciones. Una tercera forma (GnRH III) solamente está presente en teleostos (Pawson y McNeilly, 2005).

En la mayoría de los mamíferos la regulación de la secreción de LH y FSH es llevada a cabo básicamente por el GnRH I (Pawson y McNeilly, 2005), a quien en lo sucesivo denominaremos simplemente como GnRH. La regulación diferencial del GnRH sobre la secreción de LH y FSH se logra mediante diferencias en la frecuencia de secreción pulsátil de GnRH, en la concentración de receptores para GnRH en los gonadotropos, y en las concentraciones de hormonas que intervienen en la circuitos de retroalimentación, tales como estrógenos, andrógenos, progestágenos, inhibina, activina y follistatina (Pawson y McNeilly, 2005).

Los efectos del GnRH sobre la expresión de los genes de las gonadotropinas son a mediano plazo (horas o días), y no guardan una relación directa con la secreción pulsátil de estas hormonas, aunque son indispensables para su secreción basal. En cambio, cada pulso de GnRH estimula de inmediato la secreción de un pulso de LH (pero no de FSH) a partir de los gránulos de secreción que han almacenado la hormona producida previamente (Pawson y McNeilly, 2005). La liberación de LH en respuesta a la GnRH ocurre en segundos, mientras que la síntesis de LH adicional ocurre en horas o incluso días (Ginther, 1992). Por esta razón, los antagonistas de GnRH bloquean de inmediato la secreción pulsátil de LH,

mientras que solamente inhiben la secreción de FSH después de periodos prolongados de exposición al antagonista (Guillaume et al, 2002).

Debido a que la FSH se secreta en forma constitutiva a partir de la FSH que va siendo sintetizada en respuesta a la estimulación con GnRH y activina, mientras que la LH se secreta en respuesta a cada pulso de GnRH, la diferencia en los patrones de liberación de LH y FSH dependen de la frecuencia en los pulsos.

Los tratamientos prolongados con un agonista de GnRH provocan una desensibilización (regulación a la baja) de los gonadotropos, por lo que el tratamiento crónico con agonistas de GnRH suprime la producción de gonadotropinas e inhibe un amplio espectro de funciones reproductivas en las hembras, incluyendo el desarrollo folicular, la ovulación, la función lútea, y la gestación. La ciclicidad se reanuda después de finalizar el tratamiento (Millar, 2005).

4.1.4 Regulación de la secreción de GnRH

El aumento de la liberación pulsátil de la GnRH está determinado por cambios en la comunicación transináptica, y la activación de las vías de señalización entre la glía y neuronas. Las neuronas que emplean aminoácidos estimuladores e inhibidores, y el neuropéptido kisspeptina en la neurotransmisión, son los principales reguladores de la regulación transináptica de la pubertad. La glía, por otra parte, facilita la secreción de GnRH por vías de comunicación intercelular, que se inicia principalmente por miembros de las familias de factores tróficos EGF y TGF-B (Ojeda, 2006).

El sistema KiSS-1/GPR54 es un sistema ligando-receptor. Es de destacar que el producto del gen KiSS-1 es una proteína precursora de 145 aminoácidos, que por procesamiento proteolítico resulta en la generación de péptidos tales como kisspeptina-14 y kisspeptina-13 que forman la familia de las kisspeptinas. Está bien establecido que las kisspeptinas actúan primariamente a nivel central estimulando la liberación hipotalámica de GnRH. Este es muy probablemente un efecto directo en las neuronas de GnRH, como lo indica el hecho de

que esta conjunto neuronal expresa el gen de GPR54. Se ha demostrado que el efecto de la kisspeptina para estimular la secreción de GnRH requiere de la activación de fosfolipasa-C y la movilización de calcio intracelular, así como de la captación de ERK1/2 y p38 cinasas (Navarro et al., 2007).

Los esteroides gonadales (P4 y E2) son también reguladores de la GnRH. Mientras que las neuronas de la GnRH no poseen receptores para esteroides, los esteroides gonadales deben actuar a través de otras neuronas que tienen receptores para esteroides. Los axones aferentes de estas neuronas se conducen al interior, por lo que los neurotransmisores aferentes se van hacia las neuronas de GnRH actuando a través de monoaminas, péptidos o aminoácidos. Las monoaminas involucradas son catecolaminas (dopamina y noradrenalina) e indolamina (serotonina). La noradrenalina suprime los pulsos de LH y en contraste la noradrenalina desencadena la secreción de LH cuando interactúa junto con el estradiol. La noradrenalina está involucrada en los mecanismos que desencadenan la oleada preovulatoria de LH en conjunto con la adrenalina.

La dopamina inhibe la liberación pulsátil de LH y también contribuye con la retroalimentación negativa del estradiol y por lo tanto es posible que juegue un rol importante en los animales prepúberes.

La serotonina inhibe tanto la liberación pulsátil como preovulatoria de la LH, pero también tiene efectos estimulantes asociados a la oleada preovulatoria. En resumen, las monoaminas interactúan con esteroides para alterar la secreción de GnRH (Ginther, 1992).

Varios neuropéptidos son capaces de alterar la secreción de GnRH. Entre ellos se encuentran los opiáceos, beta-endorfinas y encefalinas. Los péptidos opioides endógenos, modulan a la LH por medio de la supresión de los pulsos generadores de GnRH en el hipotálamo. En la yegua existe evidencia de que los opiodes están involucrados en la regulación de la liberación de LH, estos inhiben su liberación durante la estación no reproductiva y en yeguas durante la fase lútea del ciclo. Los opiodes no contribuyen a la dinámica de la fase folicular.

Por otro lado el aminoácido gamma aminobutírico (GABA), está involucrado en varias formas de inhibición en el sistema nervioso central. El GABA incrementa el intervalo entre pulsos de LH. Estos diferentes tipos de neuronas pueden modular la fisiología de las

neuronas de GnRH directamente o después de que la integración de la información neural ha sido recibida de los ovarios. Como ya se mencionó antes, muchos de estos neurotransmisores aferentes vienen de neuronas que tienen facilidad para unirse a esteroides sexuales. Por lo que estos también actúan a través de esteroides para alterar la secreción de GnRH. Así se sabe que la liberación y producción de LH por parte de la GnRH es resultado de una secuencia de eventos dinámicos previos (Hart et al., 1984).

4.2 AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE GNRH.

4.2.1 Análogos de GnRH

Los receptores para GnRH en los gonadotropos son regulados por varios factores, tales como esteroides gonadales, gonadotropinas, e inhibina, así como por el propio GnRH. La administración aguda o intermitente de un agonista de GnRH estimula la síntesis de receptores para GnRH. Sin embargo, una administración prolongada de GnRH o de sus agonistas resulta en una desensibilización de los gonadotropos pituitarios, provocando una regulación a la baja de los receptores para GnRH y la supresión en los niveles plasmáticos de LH, FSH y esteroides sexuales (Halmos et al., 1996; Ulker et al., 2001).

Aunque los análogos utilizados en forma crónica pueden inhibir la actividad ovárica en la yegua, se requieren más de 30 días de tratamiento antes de que la supresión comience. Antes de que esto ocurra la GnRH exógena estimula la liberación de LH en garañones y yeguas, por lo que para lograr la supresión es necesario pasar primero por una etapa de estimulación ovárica, situación que no es la ideal cuando lo que se requiere es un antagonismo puro (Becker y Johnson, 1992)..

4.2.2 Antagonistas de GnRH

En contraste con los agonistas de GnRH, los cuales requieren una continua administración para inducir una regulación a la baja de los receptores (Becker y Johnson, 1992), el uso de

un antagonista puede lograr este efecto con la aplicación de una sola dosis. Existen varios antagonistas puros, conocidos en el mercado con los nombres de cetorelix, antarelix, abarelix y ganarelix, los que han sido puestos a prueba para diversas aplicaciones clínicas (Halmos et al., 1996; Duijkers, 1998; Briant et al, 2003; Watson et al, 2000;).

El cetorelix ha sido aprobado para su uso en ginecología humana, especialmente para el control de la estimulación ovárica en programas de fertilización *in vitro*. También tiene aplicaciones en la terapia de hiperplasia prostática benigna, cáncer de próstata, y otras aplicaciones oncológicas en humanos. Algunos estudios sugieren que el cetorelix puede ejercer una acción antiproliferativa sobre varios tumores, incluyendo el cáncer de mama, ovarios, endometrio, páncreas y próstata en los seres humanos (Duijkers, 1998).

Los antagonistas de GnRH producen un bloqueo competitivo de los receptores de GnRH, con lo que evitan la estimulación por la GnRH endógena. Esto provoca una inhibición inmediata de la liberación de gonadotropinas y esteroides sexuales (Halmos et al., 1996; Hayes et al, 1998; Duijkers, 1998; Watson et al, 2000; Ragni et al., 2001). Además del bloqueo competitivo de receptores, que constituye su principal efecto, los antagonistas de GnRH también producen una regulación a la baja de receptores membranales para GnRH en los gonadotropos (Halmos et al., 1996; Zanella et al., 2000). Después de un periodo de administración prolongada de antagonistas de GnRH se ha demostrado una disminución significativa en los niveles de RNAm para receptores de GnRH en los gonadotropos (Horvath et al., 2004).

Se ha demostrado que una sola inyección de un antagonista de GnRH disminuye significativamente el número de receptores membranales para GnRH en la hipófisis. Existen estudios que muestran los cambios en la localización subcelular de los sitios de unión de la GnRH después del tratamiento con cetorelix. Por medio de la unión de radioligandos se demostró que hay sitios de unión de alta afinidad y especificidad para GnRH en el núcleo y no solo en las membranas de los gonadotropos. Se sabe que la regulación a la baja de los receptores de GnRH en la membrana de las células de la hipófisis después del tratamiento con cetorelix está acompañado por un aumento

significativo en la concentración de sitios de unión para GnRH en el núcleo celular. Esto significa que el poderoso efecto del antagonista no se debe solo a la ocupación competitiva de los sitios de unión para GnRH y a una regulación a la baja de los receptores membranales, ya que los antagonistas también parecen iniciar cambios intracelulares en la distribución de receptores para GnRH debido a la internalización y traslocación de los receptores membranales. (Halmos y Schally, 2002)

La administración prolongada de bajas dosis de un antagonista de GnRH puede producir la misma inhibición en la secreción de LH que una sola administración a dosis altas. (Magdolna et al., 2001; Duijkers et al., 1998).

La regulación a la baja de los receptores por la administración prolongada de antagonistas de GnRH es reversible y la recuperación completa ocurre de 2 a 5 meses después de haber terminado el tratamiento (Zanella et al., 2000). Se sabe que después de terminar un periodo prolongado de tratamiento con antagonistas de GnRH la recuperación de la secreción de FSH es más rápida (2 meses) que la LH (más de 3 meses) (Halmos et al., 1996; Magdolna et al., 2001; Halmos y Schally, 2002; Jacek et al., 1993).

4.2.3 Efecto diferencial de los antagonistas de GnRH sobre la secreción de LH y FSH

Los antagonistas de GnRH suprimen mucho más la secreción de LH que la de FSH. Incluso en animales con una supresión marcada de la secreción de LH no se afectan los niveles plasmáticos de FSH. Se ha sugerido varios mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo este efecto diferencial. Uno puede ser que la supresión de la secreción de FSH requiera de una dosis mayor. También se ha sugerido que pueden existir diferentes poblaciones de gonadotropos responsables de la secreción de cada gonadotropina, que diferirían en su afinidad por la GnRH. Otra explicación podría ser que una vez que la GnRH actúa sobre los gonadotropos para aumentar la secreción de FSH se produce un efecto de larga duración a nivel post-receptor (Horvath et al., 2004).

Otra explicación es que la tasa de eliminación metabólica de la FSH es mucho más lenta que para la LH. La rápida tasa de eliminación de la LH produce una disminución de los niveles sanguíneos de LH mucho más abrupta que la disminución de las concentraciones de FSH, incluso cuando la tasa de secreción es similar. (Schwartz, 1983)

Otra posibilidad sería que la inhibición del desarrollo de folículos dominantes debido a la ausencia de LH resulta en una secreción insuficiente de inhibina, lo que permite que la secreción de FSH continúe siendo estimulada por la activina hipofisiaria aun en ausencia de estimulación por parte del GnRH (Pawson y McNeilly, 2005). Este concepto es apoyado por los resultados de estudios de lesiones del hipotálamo medio basal en los que la secreción de LH cae rápidamente a niveles indetectables, mientras la FSH permanece detectable por 24 horas. Todo esto sugiere que la secreción de FSH es menos dependiente de la regulación por GnRH que la LH debido a diferentes procesos de retroalimentación gonadal a nivel hipofisiario (Kartun y Schwartz, 1987)

4.2.4 Efectos de antagonistas de GnRH en equinos

En yeguas el tratamiento con el antagonista de GnRH antarelix en dosis de 0.01 mg/kg/día durante 3 a 6 días interrumpe y bloquea totalmente la oleada preovulatoria de LH. Sin embargo si estas yeguas se tratan con hCG a dosis de 1600 UI durante el segundo día de tratamiento responden ovulando, lo que demuestra que una pequeña elevación en las concentraciones de LH endógena puede ser suficiente para inducir la ovulación. Sin embargo, la ovulación puede ser pospuesta hasta por 13 días en yeguas a las que se les aplica antarelix por 3 días, sin afectar la integridad de los cuerpos lúteos (Briant et al., 2003).

También existen estudios en los que se compararon los efectos de dos antagonistas de GnRH (antarelix y cetorelix) en yeguas. En dichos estudios el antarelix mostró tener mayor efecto que el cetorelix, al retrasar la ovulación hasta por 12 días en el 100% de las yeguas, mientras que el cetorelix solo lo hizo en el 40% de las yeguas. Tal vez esta

diferencia en la efectividad del antarelix sobre el cetorelix se deba a la diferencias en la farmacocinética de los dos antagonistas, ya que la vida media del antarelix es más prolongada que la de cetorelix (Briant et al., 2003).

El antarelix ha demostrado ser capaz de ejercer un efecto inhibitorio sobre la secreción de FSH en animales ovariectomizados. Sin embargo, en animales intactos los resultados han sido variables, existiendo estudios en los que no ejerce ningún efecto sobre la secreción de FSH (Briant et al., 2003). La ausencia del efecto del antarelix para inhibir la secreción de FSH puede ser el resultado del balance entre el efecto negativo directo sobre la hipófisis y un efecto positivo indirecto mediado por la inhibición de la LH, que resulta en una disminución del desarrollo folicular y por lo tanto de la secreción de estradiol e inhibina, que por lo tanto dejan de suprimir la secreción de FSH (Guillaume et al., 2002).

La administración de antarelix durante la fase lútea de yeguas vacías provoca una disminución de la función lútea y de las concentraciones de progesterona, sin llegar a provocar una luteólisis prematura (Watson et al, 2000).

4.3 FISIOLOGÍA DE LA GESTACIÓN EQUINA

4.3.1 Tránsito oviductual

Entre el día 6 y 7 postovulación el embrión equino atraviesa el oviducto y llega al útero a través de la papila útero-tubárica. Durante el transporte por el oviducto, el embrión en estado de mórula secreta PGE2 para relajar las fibras del músculo liso del oviducto, lo que permite su paso hacia el cuerno uterino. En cambio, si el óvulo no es fertilizado, no secreta PGE2, por lo que no puede ser transportado hacia el útero y queda retenido en el oviducto (Allen y Wilsher, 2009).

El embrión llega al útero en etapa de blastocito y poco después comienza una expansión relativamente rápida que resulta en el adelgazamiento y pérdida de la zona pelúcida. Sin embargo, durante la formación del blastocito se deposita entre el trofoblasto y la zona pelúcida una cápsula formada de glicoproteínas ricas en mucina, serina y treonina, que permanece rodeando al embrión hasta el día 25 o 26 de la gestación. Durante este período la cápsula evita la elongación del blastocito y le confiere resistencia a la presión ejercida por las contracciones uterinas. Además la cápsula proporciona una matriz que favorece la absorción de secreciones de las glándulas endometriales. (Allen y Wilsher, 2009)

4.3.2 Reconocimiento materno de la gestación

El reconocimiento materno de la gestación permite a la hembra gestante alargar la vida del cuerpo lúteo y asegurar su función secretora más allá de lo que ocurre durante un ciclo estral. Esto permite mantener un soporte progestacional adecuado para el mantenimiento de la gestación. En la yegua no gestante, alrededor del día 13 postovulación se inicia un periodo de secreción pulsátil de Prostaglandina $F2\alpha$ que destruye el cuerpo lúteo. Esto no ocurre en aquellas yeguas que presentan un embrión viable (Allen, 2001, Ginther, 1992), ya que la presencia del embrión evita el establecimiento de un patrón pulsátil de secreción de $PGF2\alpha$, además de promover la expresión de factores indirectos como la $PGE2$ que colabora para mantener la continuidad de la función lútea (Watson y Sertich, 1990; Ealy et al., 2010)

La $PGF2\alpha$ es un agente luteolítico muy potente responsable de destruir el cuerpo lúteo (Arosh et al., 2004). Para que esto ocurra, al final del ciclo estral es necesario que el útero desarrolle receptores para oxitocina, ya que esta hormona estimula la secreción de $PGF2\alpha$ en el endometrio. A su vez la $PGF2\alpha$ estimula la secreción de más oxitocina, produciéndose una retroalimentación positiva entre oxitocina y $PGF2\alpha$ que lleva a la destrucción del cuerpo lúteo. En la yegua la oxitocina es producida por el endometrio, a diferencia de lo que ocurre en rumiantes, en los que el cuerpo lúteo es quien secreta la oxitocina (Díaz et al., 2002).

Para bloquear el proceso de destrucción del cuerpo lúteo en la yegua preñada, el reconocimiento de la gestación en realidad comienza desde el día 8 post-ovulación, cuando el embrión se mueve completamente libre en el lumen uterino, impulsado por contracciones peristálticas del miometrio promovidas por la PGE2 y PGF2 α secretadas por el embrión. De esta forma, el embrión recorre muchas veces cada sección del lumen uterino, moviéndose desde un cuerno hasta el otro de 10 a 20 veces por día (Griffin y Ginther 1990). Durante este proceso, el embrión secreta sustancias que al actuar sobre células del endometrio suprimen la regulación positiva de los receptores de oxitocina que se presentan entre los días 10 y 16 post-ovulación (Allen, 2001), con lo que se evita la secreción pulsátil de PGF2 α y por lo tanto la luteolisis. En el día 16 de la gestación el embrión deja de moverse debido al incremento tanto del tono miometrial como del diámetro del embrión, por lo que ocurre la fijación de la vesícula embrionaria en la base de uno de los cuernos uterinos (Allen, 2001; Ealy et al., 2010).

4.3.3 Formación de las membranas fetales

A partir del día 16 el trofoblasto, que en este momento ya recibe el nombre de corion, comienza a emitir unas proyecciones, llamadas pliegues amnióticos, que se fusionan alrededor del embrión para formar el saco amniótico que envuelve al embrión. A partir del día 20 de la gestación el embrión está completamente contenido dentro del líquido amniótico, el cual cumple funciones de protección mecánica, además de tener propiedades bacteriostáticas y lubricantes, estas últimas de importancia durante el parto. Además el feto constantemente traga líquido amniótico, lo que puede ser importante para el desarrollo del aparato digestivo. La mayor parte del líquido absorbido por el aparato digestivo del feto será filtrado por los riñones fetales, produciéndose orina que es descargada hacia la cavidad alantoidea a través del conducto del uraco (Zarco y Boeta, 2000).

El corion, por su parte, ahora forma una membrana que delimita por completo a la vesícula embrionaria. Dentro del corion, y dorsalmente al embrión, queda contenido el saco vitelino

que en ese momento ocupa la mayor parte de la vesícula embrionaria (Allen y Wilsher, 2009).

Poco después de la fijación de la vesícula embrionaria ocurre la orientación del embrión, que se coloca al lado contrario con respecto al sitio de inserción del mesometrio en el útero. Por esta razón, cuando el embrión comienza a ser visible con el ultrasonido dentro de la vesícula embrionaria (día 21 de la gestación) generalmente se encuentra localizado en la parte ventral de la vesícula, mientras que la parte dorsal de la vesícula está ocupada por el saco vitelino. Posteriormente y conforme se desarrolla el alantoides el embrión va siendo gradualmente desplazado hacia la región dorsal de la vesícula (Ginther, 1992).

Alrededor del día 20 comienza a formarse una evaginación del intestino posterior, la cual al crecer se proyecta hacia el exterior del embrión para formar el saco alantoideo, el cual mantiene el contacto con el interior del embrión a través de lo que posteriormente será el cordón umbilical (Zarco y Boeta, 2000). La superficie exterior del alantoides está formada por tejido mesodérmico que se vasculariza rápidamente, y hacia el día 24 ó 25 el corazón del embrión hace circular cantidades significativas de sangre por el alantoides. Al ir creciendo, el alantoides va ocupando el espacio localizado por debajo del embrión, llegando a ponerse en estrecho contacto con el corion para formar el corialantoides. Entre el día 25 y el día 33 de la gestación el alantoides va creciendo al mismo tiempo que el saco vitelino va disminuyendo de tamaño. Hacia el día 40 de la gestación el saco vitelino ha desaparecido y el embrión ha llegado al polo superior (Ginther, 1992; Zarco y Boeta, 2000).

Hacia el día 30 de la gestación, en el sitio de unión entre el saco alantoideo en crecimiento y el saco vitelino en regresión se forma una banda de tejido avascular, denominado cinturón coriónico. A partir de esta banda se desprenden las células coriónicas que colonizarán el endometrio para formar las copas endometriales (Allen, 2000).

A partir del día 40, una vez que ha comenzado la invasión del endometrio materno por parte de las células del cinturón coriónico, comienza una interacción entre las células del

endometrio materno y las células no invasivas del corialantoides equino, comenzando la formación de microvellosidades tanto del lado materno como del lado fetal. En la interfase materno-fetal se proyectan microvellosidades del corialantoides en forma de dedos, que se ramifican de dos a tres veces y a su vez se separan unas de otras en estrechas intervalos para ampliar la superficie de contacto entre el corion y el endometrio en el endometrio. Para el día 60 los componentes maternos y fetales se han interdigitado en forma estrecha, comenzando una extensa ramificación. Tanto las microvellosidades del lado materno como las del lado fetal están profundamente irrigadas por una amplia red capilar, por lo que hacia el día 120 de la gestación se han formado verdaderos microplacentomas en toda la superficie de la placenta, con microcotiledones del lado embrionario y microcarúnculas del lado materno, lo que permite un extenso intercambio de gases, nutrientes y desechos entre la circulación materna y circulación fetal (Allen, 2001; Allen y Wishler, 2009).

4.3.4 Hormona luteinizante (LH)

En el quinto día postovulación las concentraciones de LH disminuyen a niveles basales similares a los que se encuentran a la mitad del diestro. Alrededor del día 32 de la gestación se produce una oleada ovulatoria de LH, después de lo cual vuelve a niveles basales, aparentemente permaneciendo así el por el resto de la gestación. Sin embargo, a partir de que comienza la secreción de eCG no es posible diferenciar adecuadamente entre la secreción de eCG y la de LH (Ginther, 1992).

4.3.5 Hormona folículo estimulante (FSH)

Evans e Irvine (1975) midieron las concentraciones de FSH en el suero de yeguas gestantes del día 24 al día 78 de la gestación y encontraron que durante todo este periodo ocurrían oleadas de FSH a intervalos de 10 a 11 días, tal y como ocurre durante el ciclo estral, durante el cual la FSH estimula una o dos ondas foliculares durante cada ciclo, El perfil de FSH durante la gestación temprana es comparable al perfil del diestro, aunque los valores

mínimos de FSH durante la gestación son más altos que los que se ven al final del diestro. Así, las concentraciones durante los primeros 60 días de la gestación son relativamente altos, seguidos por una disminución para llegar a niveles basales en el segundo tercio de gestación, aunque con ocasionales elevaciones hacia el final de la gestación que resultan en oleadas foliculares asociadas con el inicio del parto (Allen, 1984).

4.3.6 Resurgencia del cuerpo lúteo primario

La gestación temprana se caracteriza por tener bajas concentraciones de LH debido a la retroalimentación negativa ejercida por la progesterona. Sin embargo, como ya se mencionó, continúan ocurriendo oleadas de secreción de FSH, que durante el primer mes de la gestación promueve el desarrollo de folículos dominantes que no llegan a ovular. (Miller et al., 1980).

Al inicio de la gestación, la gran afinidad de la LH por sus receptores en las células del cuerpo lúteo primario permite que este se mantenga viable pese a las bajas concentraciones de LH circulantes en esta etapa (Holtan et al., 1975; Bergfelt y Adams, 2007). Así, durante los primeros 35 días de la gestación la función lútea es mantenida principalmente por la LH materna (Ginther, 1992). Sin embargo, las concentraciones de progesterona circulante disminuyen gradualmente entre el día 12 y 30 post-ovulación en la yegua gestante, recuperándose significativamente a partir del día 35 debido a la estimulación ejercida por la gonadotropina coriónica equina (eCG), la cual es producida en altas concentraciones por las copas endometriales en gestaciones equinas desde el día 35 hasta el día 120-150 de la gestación (Allen, 1984). Durante todo este período la eCG tiene la capacidad de estimular a la glándula lútea primaria, lo que se refleja en un aumento de su diámetro y concentraciones de progesterona (Bergfelt et al., 1989; Squires et al., 1974). La eCG se puede encontrar en el plasma sanguíneo a partir del día 35-36 de la gestación, y la progesterona comienza a incrementarse desde el primer día en que se detecta la eCG, alcanzando importantes elevaciones dos días después (Allen 1984).

El incremento en las concentraciones de progesterona que se produce a partir del día 35 de la gestación es inicialmente debido a una estimulación de la actividad del cuerpo lúteo primario (Ginther, 1992), ya que aún no se ha producido la formación de cuerpos lúteos secundarios. Este resurgimiento no solo resulta en el incremento de la producción de progesterona sino también en el incremento en la secreción de estrógenos. (Daels et al, 1998; Allen, 2000).

4.3.7 Cuerpos lúteos secundarios, accesorios y suplementarios

A partir del día 40 de la gestación la secreción de eCG estimula la formación de glándulas lúteas secundarias y/o accesorias, que se convierten en fuentes adicionales de progesterona (Bergfelt et al., 1989). Los cuerpos lúteos secundarios son los que se forman a partir de folículos que ovulan durante la gestación, mientras que los cuerpos lúteos accesorios se forman a partir de folículos anovulatorios que se luteinizan. Ambos tipos de cuerpo lúteo se pueden agrupar bajo la denominación de cuerpos lúteos suplementarios. Independientemente de su tipo, los cuerpos lúteos suplementarios persisten hasta los 150 días de gestación, cuando la placenta está lo suficientemente desarrollada para encargarse de mantener la gestación exitosamente (Ginther, 1992; Martin et al., 1989; Bergfelt et al., 1989; Squires et al., 1983).

Se ha comprobado que los cuerpos lúteos secundarios/accesorios no se presentan en todas las gestaciones y que su desarrollo en el tiempo es extremadamente variable, lo que sugiere que no son indispensables para mantener la gestación (Ginther, 1992; Boeta y Zarco, 2012). Se tienen evidencias de yeguas que mantuvieron la gestación solamente con la glándula lútea primaria, especialmente si las yeguas fueron servidas al final de la época ovulatoria, cuando existe un pobre desarrollo folicular que no permite la formación de estructuras lúteas accesorias (Bergfelt y Adams, 2007).

El control de la formación y mantenimiento de los cuerpos lúteos suplementarios se atribuye a la presencia de eCG. El papel de dicha hormona en la inducción de ovulación y/o

luteinización folicular durante la gestación se fundamenta en lo siguiente: 1) el estrecho intervalo entre el inicio de la producción de eCG y la formación de las primeras glándulas lúteas suplementarias 2) el continuo incremento en el número de cuerpos lúteos en presencia de eCG, 3) la buena correlación entre las concentraciones de eCG y las concentraciones de progesterona circulantes, y 4) la regresión del cuerpo lúteo después de que la eCG no es detectable en la sangre (Bergfelt y Adams, 2007; Boeta y Zarco, 2012).

4.3.8 Folículos hemorrágicos anovulatorios (FHAs)

Son folículos dominantes que se caracterizan por presentar una falla en la ovulación a pesar de haber llegado a un tamaño similar o mayor al de un folículo preovulatorio. En ellos se produce una hemorragia que los llena con un coágulo de sangre, el cual en el 90% de los casos es invadida por tejido lúteo (Ginther et al., 2006, 2007).

Es importante mencionar que existen diferencias entre el cuerpo hemorrágico (CH) normal (que se forma después de una ovulación) y los FHAs; ya que en la primera estructura la sangre se coagula de inmediato conforme se extravasa hacia un antro folicular que previamente fue evacuado por la ovulación, lo que resulta en la formación de un cuerpo lúteo. En cambio, en los FHAs se produce un retraso en la coagulación al mezclarse la sangre con el líquido folicular que continua presente dentro del folículo. Con un ultrasonido modo B no es posible distinguir entre un FHAs y un Cuerpo hemorrágico, excepto por el hecho de que el cuerpo hemorrágico tiene un diámetro considerablemente menor que el folículo preovulatorio al que sustituye, mientras que un FHAs tiene in diámetro similar o mayor al del folículo a partir del cual se forma (Ginther et al., 2007). Los FHAs se forman aproximadamente en el 5 al 20% de los ciclos estrales que ocurren durante las épocas de transición hacia la época ovulatoria (marzo y mayo) o hacia la época de anestro (septiembre y octubre), aunque en un estudio retrospectivo se encontró que los folículos hemorrágicos se presentaban con mayor frecuencia en los meses de mayo y agosto (Cuervo-Arango y Newcombe, 2010).

En estudios realizados durante la época de transición se ha observado que los FHAs se forman cuando el desarrollo de un folículo dominante no ovula debido a deficiencias relativas en la secreción de LH o por una secreción insuficiente de estrógenos por parte del folículo dominante. Esta deficiencia lleva a una reducción en el flujo sanguíneo y en las concentraciones de diversos factores en el líquido folicular (Acosta et al., 2004). De especial importancia para la luteinización de FHAs es la deficiencia relativa en las concentraciones de VEGF, ya que el desarrollo de un cuerpo lúteo de tal dimensión debe mantener una elevada angiogénesis, estimulada principalmente el VEGF expresado parácrinamente por las células lúteas. (Acosta et al, 2004; Al-zi'abi, 2003).

Para que se produzca la ovulación el pico de LH induce la síntesis de prostaglandinas por parte de las células de la granulosa (Sirois y Dore, 1997). Estas prostaglandinas de origen folicular son esenciales para la ovulación, ya que la aplicación intrafolicular o sistémica de inhibidores de la síntesis de prostaglandinas provoca la luteinización del folículo sin previa ruptura y liberación del ovocito (Armstrong y Greenwich, 1972; Killick y Elsein, 1987; Salhab et al., 2003).

Los folículos anovulatorios pueden alcanzar tamaños que oscilan entre los 5 y 15 cm de diámetro y persistir hasta por 2 meses. Su crecimiento desmedido se puede deber al paso continuo de sangre hacia su interior. Después de unos días, la presencia de sangre en los FHAs hace que se forme una masa gelatinosa hemorrágica que puede ser detectada ecográficamente como puntos ecogénicos dispersos que flotan libremente en el líquido folicular. En algunos casos se observan bandas fibrosas ecogénicas atravesando el lumen folicular (Salhab et al., 2003).

En los FHAs generalmente se forma tejido luteinizado que provoca un engrosamiento visible de la pared. La presencia de tejido luteinizado permite que en algunas yeguas con FHAs se presente una concentración elevada de progesterona plasmática (Armstrong y Greenwich, 1972; Killick y Elsein, 1987; Salhab et al., 2003).

4.3.9 Progesterona lútea

La síntesis de todas las hormonas esteroideas depende en forma absoluta del transporte de colesterol desde el citoplasma hasta la membrana mitocondrial interna (Devoto et al., 2002), donde el complejo enzimático colesterol P450_{scc} corta la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona (Watson et al., 2000). El punto crítico para la regulación de la entrada de colesterol a la mitocondria es una proteína denominada proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis StAR (Belin et al, 2000; Stocco, et al, 2001; Christenson y Devoto, 2003). Las hormonas gonadotrópicas, como la LH y la eCG, estimulan la síntesis de StAR en sus células blanco (Christenson y Strauss, 2001).

Una vez dentro de la matriz mitocondrial, el colesterol es atacado por el sistema enzimático P450_{scc} para transformarlo en pregnenolona (Stocco et al, 2001; Boerboom y Sirois, 2001). Para ello la P450_{scc} corta la unión entre los carbonos 20 y 22 del colesterol, con lo que se separa la cadena lateral de 6 carbonos (22 al 27) del colesterol, lo que produce como resultado ácido isocaproico y pregnenolona.

Una vez sintetizada la pregnenolona solo se requiere un paso más para sintetizar progesterona. Para ello se requiere que sobre la molécula de pregnenolona recién formada ingrese al retículo endoplásmico liso, donde la enzima 3 β -HSD (3 β -deshidrogenasa de hidroxisteroides) la convertirá en progesterona (Stocco et al, 2001; Christenson y Devoto, 2003). La 3 β -HSD tienen dos acciones sobre la molécula de pregnenolona, primero se produce la oxidación del grupo hidroxilo en el carbono 3 de la pregnenolona y en segundo lugar, como consecuencia de la oxidación se produce la isomerización del doble enlace del anillo A, que cambia de posición.

Durante la diferenciación de las células de la granulosa del folículo en células lúteas capaces de producir grandes cantidades de progesterona se produce un gran aumento en la expresión de las enzimas necesarias para la conversión de colesterol a progesterona (P450_{scc} y 3 β -HSD), al mismo tiempo que se inactivan las enzimas que intervienen en la

conversión de progesterona en estrógenos, por ejemplo la P450 aromatasa (Sanderson, 2006).

A pesar de que la progesterona retroalimenta negativamente sobre la liberación de GnRH y LH en el hipotálamo e hipófisis respectivamente, en la yegua gestante la producción de progesterona por el cuerpo lúteo primario es mantenida por la secreción de LH hipofisiaria, por lo que existe una correlación positiva entre las concentraciones de LH y las de progesterona entre el día 5 y 24 de la gestación (Belin et al., 2000).

A partir del día 40 de la gestación se comienzan a formar cuerpos lúteos suplementarios. Tanto el cuerpo lúteo primario como los suplementarios (secundarios y accesorios) secretan progesterona hasta que se produce su regresión por falta de apoyo gonadotrópico al ser destruidas las copas endometriales que producían eCG (Boeta y Zarco, 2012). Las concentraciones de progesterona en el cuerpo lúteo entre el día 41 y el día 90 de la gestación son similares a las concentraciones durante el diestro. In *vitro* tanto los cuerpos lúteos primario como los cuerpos lúteos suplementarios son capaces de producir progesterona desde el día 100 a 198, aunque su producción disminuye marcadamente después del día 160. Las concentraciones de progesterona durante la primera mitad de la gestación varían de acuerdo al número de cuerpos lúteos suplementarios que se forman durante la gestación (Ginther, 1992; Boeta y Zarco, 2012), por lo que las yeguas con concentraciones elevadas de eCG, que forman más cuerpos lúteos suplementarios, tienen también mayores concentraciones de progesterona circulante (Boeta y Zarco, 2012).

4.3.10 Importancia de la progesterona durante la gestación

La progesterona es la principal hormona necesaria para mantener la viabilidad del embrión y estimular la función de algunas proteínas uterinas específicas. Los órganos blanco de acción de esta hormona son el aparato reproductivo, la glándula mamaria y el eje hipotálamo-pituitario-gonadal. En el útero la progesterona actúa tanto sobre el tejido glandular del endometrio como sobre el músculo del miometrio. (Mckinnon et al., 1988).

En las yeguas la progesterona es producida por tejido lúteo (de cuerpos lúteos primarios y/o suplementarios) durante los primeros 150 días de la gestación. Adicionalmente, a partir del día 80 y hasta el término de la gestación (día 320-345) la unidad fetoplacentaria sintetiza 5- α -pregnanos (P5), lo que indica un cambio de la fuente de progesterona ovárica a placentaria (Ousey et al., 2005). Por esta razón la ovariectomía en yeguas gestantes durante los primeros cuarenta y cinco días de la gestación resulta siempre en aborto, mientras que si se realiza después del día 140 no afecta la continuidad de la gestación. El intervalo entre el día 50 y el día 70 es un periodo crucial, pues de 20 yeguas gestantes, 9 abortaron cuando se les extrajeron los ovarios. Esto demuestra que la fuente ovárica de progesterona es necesaria para el mantenimiento de la gestación en algunas yeguas hasta el día 70, pero no es siempre esencial después del día 50 (Ginther, 1992).

La progesterona del cuerpo lúteo primario es necesaria para la regulación de las interacciones físicas entre el embrión y el útero (movilidad del embrión, fijación y orientación) y para la estimulación de las secreciones de las glándulas endometriales. Se ha observado que si se elimina la fuente de progesterona durante el día 12 postovulación disminuye el grado de movilidad del embrión y falla la fijación de la vesícula embrionaria (Mckinnon et al., 1988).

También es muy importante el papel de la progesterona en la reducción de la contractilidad del útero, para lo cual actúa hiperpolarizando el miometrio y disminuyendo el número de uniones gap y receptores involucrados en la contractibilidad del miometrio (Ousey et al., 2003). También es posible que la progesterona influya sobre la concentración de nutrientes del saco vitelino en el día 18 de la gestación (Allen, 2000).

4.3.11 Copas endometriales

Alrededor del día 25 de la gestación comienza a formarse el cinturón coriónico, que en esta etapa consiste en una serie de pliegues del trofoblasto a lo largo de la línea formada por el

punto de unión entre el alantoides en expansión y el saco vitelino en regresión (Ginther, 1992; Stewart et al, 1995). Conforme las células de la punta de cada pliegue se multiplican rápidamente, los pliegues crecen hasta quedar, alrededor del día 32 de la gestación, comprimidos entre sí y aplanados en su superficie apical debido a la compresión ejercida por el crecimiento de la vesícula embrionaria en un espacio que está limitado por el tono del miometrio (Allen y Wilsher, 2009). Durante este proceso el cinturón coriónico va haciéndose más ancho, comenzando con alrededor de 1 mm y terminando con una anchura de alrededor de 1 cm (Ginther, 1992). Los espacios entre pliegues adyacentes del cinturón coriónico adquieren una apariencia glandular que comienza a llenarse con una secreción rica en mucopolisacáridos ácidos. Esta secreción se acumula entre el cinturón coriónico y el epitelio endometrial entre el día 35 y 37 de la gestación, y al parecer sirve como un “pegamento” entre el cinturón coriónico y dicho epitelio endometrial (Allen y Wilsher, 1992).

Hacia el día 35 el cinturón coriónico “maduro” comienza a desprenderse, primero en ciertas secciones y al final en forma completa, del resto de trofoblasto, preparándose para comenzar la invasión del epitelio endometrial (Ginther, 1992; Allen y Wilsher, 2009). En esta etapa el alantoides ha crecido hasta ocupar un poco más de la mitad de la vesícula embrionaria, por lo que al iniciarse la invasión del endometrio el cinturón coriónico se encuentra formando una banda de 1 a 1.5 cm de ancho localizada un poco por arriba del ecuador de la vesícula embrionaria (Allen y Moor, 1972; Allen et al, 1973; Allen y Wilsher, 2009). En esta etapa los pliegues del cinturón coriónico están tan apretados unos contra otros, que la superficie apical del cinturón forma una pared sólida de células trofoblásticas cilíndricas alargadas que se mantienen unidas al epitelio endometrial por medio de la densa capa de mucopolisacáridos ácidos que secretan (Allen y Wilsher, 2009).

Entre el día 35 y el día 37, el cinturón coriónico completo se separa de la capa basal de trofoblasto que está por debajo de él, y la hilera superficial de células alargadas del cinturón coriónico comienzan a atacar y destruir el epitelio del lumen uterino, abriéndose paso a lo largo de las glándulas endometriales para penetrar más profundamente en el endometrio

(Allen y Wilsher, 2009). En este momento ya se puede notar una reacción inmune materna en contra de los antígenos paternos del complejo mayor de histocompatibilidad clase I que se expresan en la superficie de las células del cinturón coriónico, por lo que en el estroma endometrial se acumulan linfocitos y otros tipos de leucocitos (Allen, 1982; Allen y Wilsher, 2009).

Entre el día 38 y el 40 las células invasivas del cinturón coriónico se han transformado en células binucleadas, que penetran profundamente en el estroma endometrial, hasta que hacia el día 40 a 42 dejan de moverse, se agrupan y sufren hiperplasia, apretándose entre ellas para formar las copas endometriales, las cuales se establecen en el endometrio a lo largo de la línea previamente ocupada por el cinturón coriónico. El ancho de las copas endometriales es de alrededor de 1.5 cm, que corresponde al ancho original del cinturón coriónico al momento de la invasión. Sin embargo, la longitud de cada copa endometrial es muy variable, pudiendo ser de tan solo 1 a 3 cm de largo, o alcanzar hasta más de 20 cm de longitud Allen, 2001; (Allen y Wilsher, 2009).

Las copas endometriales ahora están profundamente enterradas en el estroma endometrial, y su superficie protruye hacia la luz del endometrio. La forma de esta superficie se va haciendo cóncava (de donde reciben su nombre de copas) y se va llenando de una secreción rica en eCG, conformada además por residuos de células muertas de las copas endometriales y secreciones de las glándulas endometriales. En las gestaciones de yegua con caballo las copas endometriales alcanzan su máximo tamaño y producción de eCG alrededor del día 70, y hacia el día 80-90 comienzan a hacerse pálidas conforme las células de la copa endometrial comienzan a morir y a separarse del tejido (Ginther, 1992; Allen y Wilsher, 2009). Finalmente, entre el día 120 y 140 las copas endometriales se necrosan y se separan del endometrio, quedando sus residuos flotando en el líquido uterino.

Durante el tiempo de vida de las copas endometriales se producen cambios en la respuesta inmune de la madre. A partir de la reacción inicial entre el día 40 y 42, cuando las copas endometriales recién formadas están rodeadas por una gran cantidad de linfocitos y otros leucocitos (Allen, 1982), la presencia de dichas células va disminuyendo hasta llegar a su

mínimo en el día 60, posiblemente debido a una menor expresión de las moléculas del antígeno mayor de histocompatibilidad clase I (Crump et al, 1987). Sin embargo, a partir del día 60 comienzan a acumularse otra vez leucocitos, predominando linfocitos CD4+ y CD8. Los leucocitos comienzan a moverse hacia la base de la copa endometrial, infiltrándose en el tejido para destruir las células hasta que logran separar la copa del resto del tejido, provocando que se libere hacia la luz uterina (Allen y Wilsher, 2009).

Las copas endometriales están en contacto estrecho con los vasos sanguíneos en las porciones distendidas de las glándulas endometriales. Las células fetales altamente especializadas de la copa endometrial secretan eCG, que entra al torrente sanguíneo materno por medio de un complejo grupo de senos linfáticos que se desarrollan bajo cada copa. Es aquí cuando se genera una marcada reacción linfocítica-plasmacelular e histiocítica con aumento de linfocitos T, linfocitos B y linfocitos CD4+ y CD8+ además de otros leucocitos acumulados en el estroma endometrial, como macrófagos y eosinófilos en la periferia de cada copa (Kydd et al., 1991). La interacción entre estos leucocitos y las moléculas del antígeno mayor de histocompatibilidad de origen paterno, que se expresa en las células de la copa endometrial, provoca el desarrollo de altos títulos de anticuerpos anti-paternales en el suero de la yegua entre los días 10 y 14 después del desarrollo inicial de las copas (Crump et al., 1987; Donaldson et al., 1990; Allen y Wilsher, 2009). Sin embargo en el caso de yeguas con gestación equina el útero ha sido descrito como un sitio inmunológicamente privilegiado, en el cual el feto antigénicamente extraño es protegido de la respuesta inmune materna mediante un mecanismo inmunomodulador que impide que la respuesta inmune en contra de las copas endometriales se haga extensiva al resto del embrión (Adams y Antczak, 2001)

Existen diferencias en el tamaño, productividad y tiempo de vida de las copas endometriales según el tipo de cruce intra o interespecie en equinos (Allen, 1975; 1982; Allen et al, 1993; Allen y Short, 1997; Ginther, 1992). Por ejemplo el cinturón coriónico es más grande en gestaciones equinas que en las de burro, lo que parece estar bajo control genético del genotipo paterno. También se ha encontrado una influencia primordial en el

genotipo materno para determinar el tamaño y desarrollo de las copas endometriales (Sebastián y Benirschke, 2004).

El grosor y la actividad del cinturón coriónico en una gestación de yegua con caballo da lugar a copas endometriales grandes y muy activas (Ginther, 1992) que secretan altas concentraciones de eCG hacia la circulación materna, donde continúa circulando hasta los días 120-140 de gestación (Boeta y Zarco, 2005; 2010; 2012).

El genoma paterno determina el destino del cinturón coriónico, aunque es claro que el ambiente uterino ejerce una influencia primordial en todo el proceso. Es probable que el estímulo para la formación inicial del cinturón coriónico, así como el control sobre el crecimiento, maduración y propiedades invasivas del mismo, sean mediadas por factores de crecimiento mitogénicos producidos localmente, ya que durante el periodo de desarrollo del cinturón coriónico y la subsecuente invasión del endometrio existe una marcada regulación hacia arriba de las concentraciones de RNAm, proteínas y receptores para el factor de crecimiento epidermal y para el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ en el endometrio, así como para IGF2 y factor de crecimiento de los hepatocitos en los tejidos de las membranas fetales (Allen y Wilsher, 2009).

4.3.12 Gonadotropina coriónica equina

La eCG es una hormona glicoprotéica heterodimérica constituida por dos cadenas polipeptídicas (subunidad α y β), unidas de manera no covalente. La secuencia de aminoácidos es idéntica a la de la LH equina (Bousfield et al, 1987; 1996; Sugino et al, 1987) , por lo que ambas hormona se unen al receptor de LH/eCG en los tejidos equinos (Murphy y Martinuk, 1991). La subunidad α es común para todas las hormonas glicoprotéicas de una determinada especie debido a que es codificada por un solo gen, mientras que la subunidad β es específica para cada hormona y le confiere especificidad biológica a cada una de ellas. En el caso de la eCG y la LH equina, sus subunidades β son codificadas por un mismo gen expresado en tejidos diferentes, por lo que al expresarse este

gen en la hipófisis se forma la LH, mientras que al expresarse en las células de la placenta se produce eCG debido a que en cada uno de estos tejidos se produce un patrón diferente de glicosilación de las cadenas polipeptídicas (Legardinier et al., 2005).

Como ya se mencionó, la eCG es producida por células del cinturón coriónico, detectándose niveles sanguíneos por primera vez del día 35 al 42 de la gestación con la aparición de las copas endometriales, elevándose rápidamente para alcanzar su pico entre el día 55 a 70, para después declinar lentamente hasta llegar a niveles bajos o no detectables del día 120 al 150 de la gestación (Allen et al., 1993; Ginther, 1992; Sebastián y Benirschke, 2004).

A partir de que las copas endometriales se necrosan y se desprenden entre el día 100 y el día 140 de la gestación las concentraciones de eCG disminuyen marcadamente (Ginther, 1992; Allen et al., 1993; Sebastián y Benirschke, 2004).

In vivo la producción de eCG dura en promedio solamente unos 80 días (día 40 a 120 de la gestación), mientras que *in vitro* se extiende hasta por 180 días debido a que no se produce el intenso ataque por linfocitos y células plasmáticas que acompaña la respuesta inmune materna contra el antígeno MHC-I (Allen y Moor, 1972).

Es importante recordar que las células de las copas endometriales son de origen fetal, por lo que el genotipo del feto influye profundamente en la producción de eCG (Bielanski, 1956; Ginther, 1992).

Se ha estudiado extensamente el efecto del genotipo fetal por medio de diferentes cruces entre caballos y burros, así como mediante la transferencia de embriones xeno-específica, y se ha determinado que en yeguas con feto mula (yegua servida con burro) la eCG se secreta en mucho menor cantidad y durante menos tiempo que en yeguas con feto equino (Allen et al., 1993; Boeta y Zarco, 2005, 2010, 2012).

La actividad biológica de la eCG, y sus actividad relativa como FSH o LH también es afectada por el genotipo, lo que provoca grandes diferencias en sus efectos, como la formación de las glándulas lúteas accesorias (Allen et al, 1993). Así, las burras que llevan una gestación de feto burdégano (burra cruzada con caballo) tienen concentraciones muy elevadas de eCG y presentan un desarrollo folicular y una luteinización excesivas comparadas con lo que ocurre en burras servidas por burro (Allen, 2001).

En burras a las que se les transplantan embriones de caballo, las concentraciones de FSH caen y la progesterona aumenta considerablemente, coincidiendo con los altos niveles de eCG. Los receptores en los tejidos gonadales de la burra gestante con un embrión equino responden a la gran actividad de la eCG, que actúa como FSH-LH, por lo que los ovarios se hiperestimulan durante este tipo de gestación. En contraste, en yeguas a las que se les transfiere un embrión burro hay ausencia total de eCG y la progesterona no se incrementa, además de que sufren alteraciones en el desarrollo de la placenta, por lo que este tipo de gestaciones no llegan a término incluso cuando se les proporciona progesterona exógena (Allen, 2001)

El efecto paterno sobre los niveles de eCG también se ha estudiado en gestaciones de yegua con caballo, donde se han encontrado garañones que producen gestaciones con bajos o altos niveles de eCG (Ginther, 1992). También se han encontrado yeguas en las que las concentraciones de eCG no se elevan en gestaciones sucesivas, aún cuando sean cruzadas con garañones que en otras yeguas producen niveles normales de eCG (Boeta, 2008). Esto demuestra que tanto la contribución de las yeguas como el genoma de los garañones afectan los niveles de eCG en la circulación materna. Por lo tanto, se puede afirmar que la producción de la eCG es una característica heredable, por lo que se podrían seleccionar caballos con alta producción de eCG (Ginther, 1992).

Los factores de crecimiento mitogénicos producidos en el útero están bajo control genético materno y juegan un rol importante para el desarrollo del cinturón coriónico y para la estimulación de la secreción del endometrio. Para evaluar el papel de estos factores en

gestaciones híbridas se realizó un experimento en el que se produjeron embriones mula, los cuales fueron bisectados para producir hemi-embryones idénticos. Cuando los hemi-embryones se transfirieron a yeguas los factores de crecimiento producidos por el útero de la yegua se unieron débilmente a sus receptores en el corión (los cuales están bajo control genético paterno), lo que resultó en la formación de un cinturón coriónico rudimentario. En cambio, cuando la otra mitad de los hemi-embryones se transfirió a burras, los factores de crecimiento del útero materno se unieron en forma adecuada a sus receptores en el corión y estimularon el desarrollo de un cinturón coriónico mucho más extenso y activo (Allen y Short, 1997).

Si no se desarrolla adecuadamente el cinturón coriónico y falla en la invasión al endometrio alrededor del día 36-38 la interacción entre el corión y el endometrio es defectuosa y no se puede llevar a cabo la implantación, además de que se desencadena una agresiva respuesta inmune celular en contra de la placenta y el feto. En cambio, si las células del cinturón coriónico logran invadir el endometrio la estimulación antigénica que resulta en la madre induce en ella una respuesta de protección en lugar de una respuesta inmunológica y citotóxica en contra de su feto (Allen y Short, 1997).

Además del genotipo fetal, el tamaño de las copas endometriales en relación al tamaño de la yegua también puede afectar las concentraciones circulantes de eCG. Si una yegua pequeña tiene grandes copas, se esperan buenas concentraciones de eCG. Sin embargo, el tamaño de las copas es similar entre yeguas pequeñas y grandes, con un peso promedio de 10 g. En gestaciones híbridas las copas pueden variar en tamaño, por ejemplo, en las gestaciones de yeguas servidas por burro (producto mula) la secreción de eCG es pobre, y las copas se desarrollan menos (Allen, 1982). En gestaciones de burra con caballo (producto burdégano), las copas endometriales se desarrollan grandes y gruesas, produciendo grandes cantidades de eCG.

En yeguas ponis es común que se presenten concentraciones elevadas de eCG, lo que parece deberse a su menor tamaño corporal ya que hay menor dilución de la eCG

producida. El volumen de las copas es un reflejo directo del número de células de las copas y cada una de estas células secreta en forma constitutiva una cantidad de eCG constante, sin un control regulatorio por parte de otra hormona o por mecanismos de retroalimentación, por lo que la cantidad de eCG secretada depende del número total de células produciéndola (Allen y Stewart, 1993).

Las yeguas que gestan gemelos poseen dos conjuntos de copas endometriales, por lo que las yeguas que gestan gemelos bilaterales producen grandes cantidades de eCG. En cambio, en yeguas con gestación gemelar unilateral las concentraciones de eCG son similares a las de una gestación normal debido a que en estos casos generalmente solo uno de los gemelos establece un contacto adecuado entre su cinturón coriónico y el útero materno, mientras que el cinturón coriónico del otro en muchos casos está en contacto con el corión de su hermano, y no con el útero materno (Allen y Wilsher, 2009).

Existen más motivos por los cuales las concentraciones de eCG pueden variar, por ejemplo, las yeguas que se gestan en el primer estro posparto tienen mayores niveles de eCG, de igual manera las yeguas de tres o más partos producen mayores cantidades de eCG que las primíparas. Estos efectos posiblemente se deben al mayor tamaño de la superficie uterina al momento de la invasión del cinturón coriónico (Ginther, 1992; Allen y Wilsher, 2009).

4.3.13 Papel de la eCG y la LH en la gestación equina y en la gestación mular

A pesar de que existe una gran cantidad de investigaciones realizadas con la eCG, su función real en la yegua aún no se conoce exactamente, aunque se ha asumido que esta hormona participa en la generación de cuerpos lúteos suplementarios y en la manutención de los cuerpos lúteos de la gestación entre los días 40 al 120.

La evolución de las copas endometriales en los equinos parece ser un sistema para asegurar una adecuada secreción de estrógenos y progesterona a partir del cuerpo lúteo primario y los suplementarios, hasta que la unidad fetoplacentaria sea capaz de producir cantidades

suficientes para el mantenimiento de la gestación (Daels et al, 1998). De esta forma, gracias a la presencia de eCG el cuerpo lúteo primario resurge cuando ha comenzado a disminuir su producción de progesterona, y se forman nuevos cuerpos lúteos suplementarios a partir de folículos que ovulan (cuerpos lúteos secundarios) o de folículos anovulatorios que se luteinizan (cuerpos lúteos accesorios) para contribuir a la producción de progesterona, estrógenos y andrógenos (Daels et al, 1998; Urías, 2008). La producción de estos esteroides ováricos disminuye conforme las concentraciones de eCG se van reduciendo gradualmente después del día 60 de la gestación, pero al mismo tiempo la unidad fetoplacentaria crece y se hace cargo de mantener un ambiente endocrino adecuado (Allen y Stewart, 1993). El efecto esteroidogénico de la eCG podría ser esencial solo en aquellas yeguas con bajos niveles circulantes de progesterona (Allen y Stewart, 1993; Ginther, 1992; Boeta, 2008; Boeta y Zarco, 2010).

La eficiencia reproductiva al cruzar yeguas con burros es menor que la obtenida con la cruce de yeguas con caballos. Una posible causa de esta baja fertilidad es la escasa producción de eCG en las yeguas con gestación mular debido al desarrollo inadecuado y al rechazo prematuro de las copas endometriales (Allen, 2001). Así, Boeta y Zarco (2005, 2010), encontraron una mayor incidencia de abortos en yeguas gestantes con embrión mula que en gestantes con embrión caballo. A pesar de ello, muchas yeguas con concentraciones de progesterona y eCG menores a las encontradas durante gestaciones de yegua con caballo tienen gestaciones normales que llegaron a término (Boeta y Zaro, 2005; 2012), lo que sugiere que el umbral de progesterona necesario para mantener la gestación es considerablemente menor a las concentraciones que normalmente se presentan durante la gestación equina. Sin embargo, al evaluar los perfiles hormonales individuales de cada yegua, encontraron evidencias de que las yeguas con gestaciones mulares que abortaron tendían a tener concentraciones de eCG y progesterona aún menores que los de la mayoría de las yeguas con gestación mular, lo que probablemente las llevó a un estado endocrino incapaz de mantener la gestación (Zarco y Boeta, 2010).

A diferencia de lo que sucede en la gestación equina, en la gestación mular la formación del cinturón coriónico es más estrecho y delgado en yeguas preñadas con burro, dando lugar con esto a copas endometriales pequeñas, con menor secreción de eCG y una reacción inmunitaria más agresiva. Dicha reacción se caracteriza desde el principio por una infiltración masiva de linfocitos en la base de las copas (Allen, 1975), lo que interfiere con la formación normal de las mismas y resulta en un rechazo inmunológico prematuro (Allen y Short, 1997). Esto provoca que las concentraciones de eCG solamente se eleven ligeramente y de manera transitoria entre la sexta y la novena semana de la gestación (Boeta y Zarco, 2005; 2010; 2012), desapareciendo de la circulación antes de la décima semana debido a que las copas endometriales sufren necrosis temprana hacia el día 63 de la gestación (Allen y Short, 1997).

Se ha estudiado la relación entre el antígeno mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y la inflamación (reacción linfocitaria) que se produce a partir de la invasión de las células del cinturón coriónico, pero no se han encontrado diferencias dramáticas entre los complejos de histocompatibilidad del burro y el caballo. La estrecha relación filogenética entre el caballo y burro permite el éxito en las gestaciones híbridas a pesar de la presencia de aloantígenos (Sebastián y Benirschke, 2004).

Las yeguas con gestación mular que mantienen la gestación desarrollan menos cuerpos lúteos suplementarios que las yeguas con gestación equina, lo que es debido a la reducida secreción de eCG por parte de las copas endometriales (Boeta y Zarco, 2012). Sin embargo, en la mayoría de las gestaciones mulares se forman glándulas lúteas secundarias durante el corto periodo en la que la eCG se eleva ligeramente (Boeta y Zarco, 2012), lo que sugiere que al inicio de la gestación equina solamente se requieren bajos niveles de eCG para la formación de cuerpos lúteos secundarios.

Evidentemente la eCG tiene tanto una función luteotrópica como luteogénica, ya que estimula el resurgimiento del cuerpo lúteo primario (Dales et al, 1998; Boeta y Zarco, 2012) así como la formación y función de los cuerpos lúteos suplementarios (Boeta y

Zarco, 2012). Por esta razón, entre el día 4° y 12° de la gestación las concentraciones de progesterona en gestaciones mulares (en las que se produce muy poca eCG) son significativamente menores que las encontradas en gestaciones equinas (Boeta y Zarco, 2005; 2010; 2012), y el número de cuerpos lúteos suplementarios también es menor en gestaciones mulares que en gestaciones equinas (Boeta y Zarco, 2012). En estas últimas, la formación de cuerpos lúteos suplementarios en diferentes momentos de la gestación depende de que aún se encuentren elevadas las concentraciones de eCG (Boeta y Zarco, 2012).

Sin embargo, es también evidente que la eCG no es indispensable para el mantenimiento de la gestación ni para mantener una función lútea suficiente, ya que muchas yeguas servidas con burro, y algunas yeguas servidas con caballo llevan a término su gestación a pesar de tener concentraciones basales o indetectables de eCG (Boeta y Zarco, 2005; 2010; 2012). Por esta razón, se ha sugerido que en ausencia de eCG los cuerpos lúteos podrían ser sostenidos por la secreción de LH hipofisiaria (Boeta y Zarco, 2012). De esta manera, la LH y la eCG podrían tener efectos redundantes para asegurar el éxito de la gestación.

El modelo de la gestación mular, deficiente en la secreción de eCG, combinado con la administración de un antagonista de GnRH puede ser útil para diferenciar el papel de la LH y el de la eCG durante la gestación equina. Así, el objetivo del presente trabajo es comparar la generación de cuerpos lúteos suplementarios, la función lútea y la sobrevivencia fetal entre gestaciones deficientes solo en eCG (yeguas gestantes con burro), gestaciones deficientes tanto en eCG como en LH (yeguas gestantes con burro tratadas con antarelix), gestaciones deficientes solo en LH (yeguas gestantes con caballo tratadas con antarelix) y gestaciones sin deficiencia de LH o eCG (yeguas gestantes con caballo).

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Localización

El presente estudio se realizó en el antiguo Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agrícola y Ganadería (CEIEPAG) de la FMVZ, ubicado en el kilómetro 2.5 de la carretera Chalco-Mixquic, Chalco, Estado de México a 19°09' latitud norte.

5.2 Animales

Se usaron 34 yeguas clínicamente sanas, con rango de edades entre los 5 y 10 años, con un peso promedio de 280 kg y una condición corporal entre 2.5 y 3.5 en escala de 0 a 5 (Martin-Rosset, 1993). Las yeguas fueron alojadas en corrales dotados de espacio, comederos y bebederos con agua *ad libitum* y alimento a base de heno de avena y concentrado comercial.

A cada yegua se le realizó un examen físico general para descartar cualquier enfermedad, así como un examen ginecológico completo para confirmar su salud reproductiva. Posteriormente las yeguas fueron desparasitadas, pesadas e identificadas.

Diariamente se detectaron estros por medio de un macho recelador. Las yeguas que mostraban interés al semental se examinaban a través de palpación rectal y ultrasonografía para determinar el grado de desarrollo folicular y programar el servicio lo más cercano a la ovulación. Las yeguas fueron inseminadas con semen de burro o con semen de caballo según el caso. Se utilizaron dos sementales de fertilidad probada; uno de ellos, un burro de raza Kentucky de 6 años de edad y otro un caballo criollo de 9 años. Se colectó semen por medio de una vagina artificial modelo Missouri, y posteriormente se realizó la inseminación transcervical con semen fresco diluido en leche descremada ultrapasteurizada (Boeta y Zarco, 2000). Una vez confirmada la gestación (día 15 post-ovulación) se revisaban las yeguas una vez por semana para evaluar su desarrollo embrionario y la

viabilidad lútea. A partir del día 39 postovulación se asignaron al azar 8 yeguas gestantes con burro (n=8) y 9 yeguas gestantes con caballo (n=9) a los grupos tratados con antarelix, y 8 yeguas gestantes con burro y 9 yeguas gestantes con caballo a los grupos testigo.

5.3 Tratamiento con antarelix

A partir del día 39 (semana 5.5) al día 45 (semana 6.5) de la gestación a las yeguas de los grupos tratados (8 yeguas gestantes con embrión mula y 9 yeguas gestantes con embrión caballo) se les administró antarelix a una dosis de 0.01 mg/Kg/día por vía intravenosa (IV) y después, a partir del día 46 (semana 6.5) hasta el día 82 (semana 12) se cambió la vía de administración a subcutánea (SC), así como el intervalo de dosificación a una dosis por semana, de 0.07 mg/Kg. A los grupos testigo, conformados por 8 yeguas gestantes con embrión mula y 9 yeguas gestantes con embrión caballo se les administró un placebo (solución salina).

5.4 Variables evaluadas

A partir del día 39 postovulación se realizó la revisión ultrasonográfica de las glándulas lúteas y de la viabilidad del producto dos veces por semana, lo que se continuó haciendo hasta el día 120 de la gestación o bien hasta el momento en que ocurriera el aborto. Para realizar las evaluaciones ultrasonográficas se utilizó un equipo de ultrasonido de tiempo real Aloka 210 con transductor lineal transrectal de 5Mhz.

Para la evaluación de las glándulas lúteas, en cada ocasión se determinó su diámetro mediante la obtención del promedio de dos mediciones, la primera del diámetro mayor de la glándula, y la segunda realizada en forma perpendicular a la primera. Además, en cada evaluación ultrasonográfica se determinó la viabilidad fetal por medio de la presencia del latido cardiaco, movimiento fetal y las pulsaciones del cordón umbilical del producto (Boeta y Zarco, 2005).

Se determinó el volumen de cada folículo anovulatorio hemorrágico mediante la fórmula: $V = (4/3 \pi) (r^3)$. En caso de encontrarse varios FHAs en una yegua se sumaban sus volúmenes para obtener el volumen total de FHAs

Entre la semana 5 y la semana 12 (días 38 a 92 de gestación) se obtuvieron muestras sanguíneas dos veces por semana mediante punción de la vena yugular, y a partir de la semana 13 hasta la 17 (días 93 a 120 de gestación) la obtención de muestras sanguíneas se realizó una vez por semana. Las muestras se obtuvieron en tubos vacutainer sin anticoagulante. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos dentro de la primera hora posterior a su obtención para separar el suero, el cual se almacenó a -20°C hasta que se determinaron las concentraciones de progesterona y eCG en el laboratorio de endocrinología del Departamento de Reproducción de la FMVZ de la UNAM.

La determinación de las concentraciones de progesterona en suero se realizó por radioinmunoanálisis de fase sólida, empleando el Kit comercial Coat-A-Count Progesterona (Siemens Healthcare Diagnostics, Los Angeles, C.A., U.S.A.) con un límite de sensibilidad del ensayo de 0.1 ng/ml y coeficientes de variación intraensayo de 4% e interensayo del 7 %. La determinación de las concentraciones de eCG en suero se realizó por enzimoimmunoensayo (ELISA) en placas de micro titulación, basado en la técnica de sándwich (PMSG ELISA, DRG Diagnostics, Germany) (Boeta et al, 2010; 2012). El límite de detección del ensayo fue de 8.18 mUI/ml y un coeficiente de variación intraensayo de 3.25% para valores bajos y 4.78% para valores altos.

5.5 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza para mediciones repetidas con la finalidad de evaluar diferencias entre los grupos con respecto a las concentraciones plasmáticas de progesterona y gonadotropina coriónica equina, el diámetro de las glándulas lúteas primarias y secundarias y el volumen de los FHAs, utilizando como variables independientes el tipo de gestación (con caballo o con burro), tratamiento con antarelix (yeguas tratadas o sin tratar

con antarelix) y la semana de gestación. Adicionalmente, en el caso de las yeguas con gestación mular tratadas con antarelix se compararon las concentraciones de eCG y progesterona de las yeguas que abortaron con las de las yeguas que no abortaron y contra el promedio de las yeguas testigo con gestación mular. Se comparó el número de muertes embrionarias y número de cuerpos lúteos secundarios y accesorios presentes en cada grupo de yeguas por medio de la prueba exacta de Fisher.

Diagrama del experimento

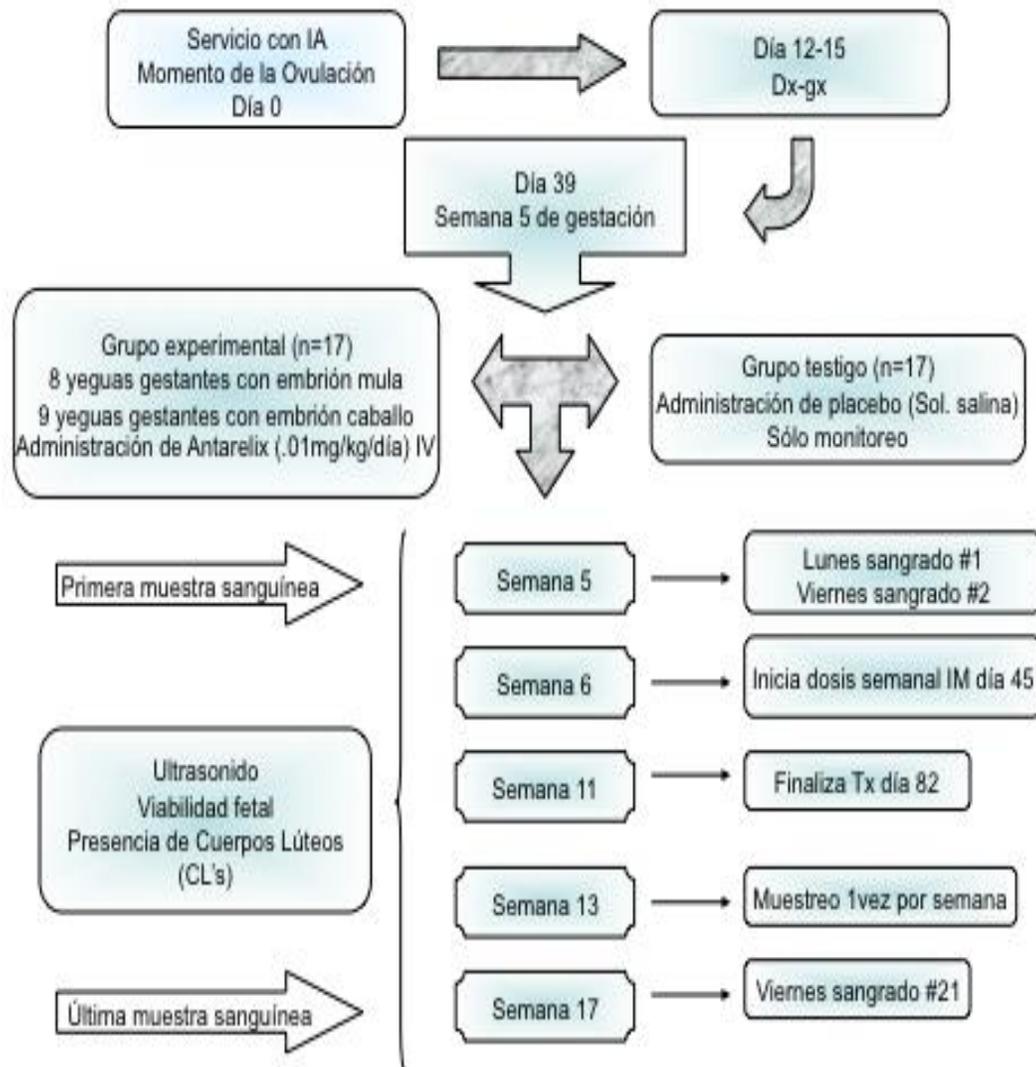


Figura 1. Diagrama que muestra las actividades llevadas a cabo durante el trabajo de campo en ambos grupos de animales. IA= Inseminación Artificial; Dx gx= Diagnóstico de gestación; n= número de animales; IV= Intravenosa; IM= Intramuscular.

6. RESULTADOS

6.1 Pérdidas gestacionales

En el cuadro 1 se observa que en las yeguas con gestación mular tratadas con antarelix se produjo un 62.5 % de abortos, mientras que no se presentaron abortos en las yeguas con gestación equina que recibieron el mismo tratamiento. Tampoco se presentaron abortos en las gestaciones de ambos grupos testigo.

6.2 Incidencia de cuerpos lúteos secundarios y/o accesorios

En el cuadro 1 también se observa que todas las yeguas de los grupos testigo formaron por lo menos un cuerpo lúteo secundario, y que el tratamiento con antarelix redujo significativamente ($p < 0.05$) el porcentaje de animales con cuerpo lúteo secundario tanto en yeguas gestantes con embrión equino como en las gestantes con embrión mula. Por otra parte, el porcentaje de yeguas que formaron cuerpos lúteos accesorios fue mayor ($p < 0.05$) en las yeguas con gestación equina que en las yeguas con gestación mula que recibieron el mismo tratamiento (testigo o antarelix). Al comparar el porcentaje de yeguas con cuerpos lúteos accesorios entre animales con el mismo tipo de gestación pero diferente tratamiento no se encontraron diferencias significativas, aunque vale la pena destacar que en el grupo con gestación mular y tratado con antarelix ninguna yegua desarrollo cuerpos lúteos accesorios, mientras que tres yeguas testigo con gestación mular si desarrollaron cuerpos lúteos accesorios.

Cuadro 1. Porcentajes de pérdidas fetales y presencia de cuerpos lúteos secundarios y accesorios en los dos tipos de gestación.

	Gestación mular (n=8)		Gestación equina (n=9)	
	Antarelix	Testigo	Antarelix	Testigo
Pérdidas gestacionales	5/8 (62.5%) a	0/8 (0%) b	0/9 (0%) b	0/9 (0%) b
Yeguas con cuerpos lúteos secundarios	1/8 (12.5%) b	8/8 (100%) a	2/9 (22.2%) b	9/9 (100%) a
Yeguas con cuerpos lúteos accesorios	0/8 (0%) b	3/8 (37.5%) ab	7/9 (77.7%) a	8/9 (88.8%) a

a,b Para una determinada variable (renglón) valores que no comparte por lo menos una literal son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$)

6.3 Concentraciones de gonadotropina coriónica equina

Las concentraciones de eCG fueron significativamente afectadas por el tipo de embrión ($p < 0.01$), la semana ($p < 0.01$), y la interacción entre tipo de gestación y semana ($p < 0.05$). En la figura 2 se observa que las concentraciones de eCG fueron significativamente mayores en los dos grupos con gestación equina (antarelix y testigo) que en los grupos con gestación mular ($p < 0.01$), y que el tratamiento con antarelix no modificó la secreción de eCG en ninguno de los dos tipos de gestación ($p > 0.05$). La diferencia entre gestaciones mulares y equinas se originó entre la semana 6 y 8, cuando en las gestaciones equinas la eCG registró un pronunciado incremento mientras que en las gestaciones mulares no ocurrió dicho aumento.

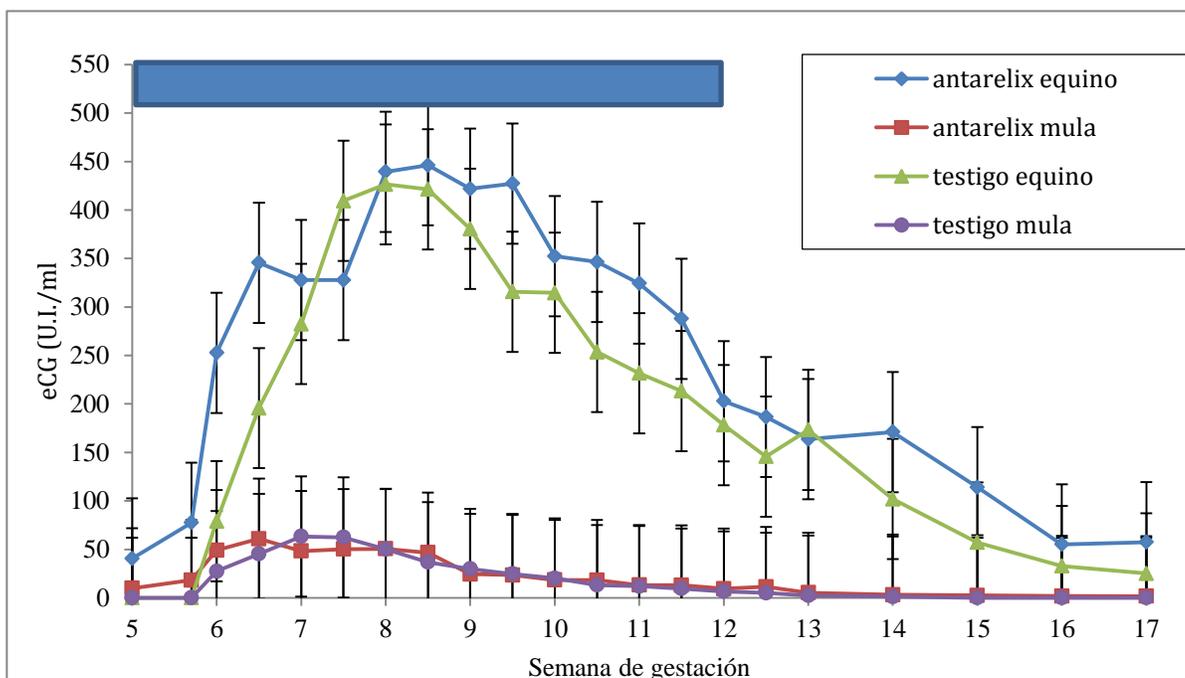


Figura 2. Concentraciones de eCG en yeguas con gestación equina o mular tratadas (antarelix) o no (testigo) con un antagonista de GnRH a razón de 0.01mg/Kg/día. Las concentraciones promedio de eCG de los grupos con gestación equina fueron significativamente mayores que las de los grupos con gestación mular ($p < 0.01$). La barra sólida horizontal indica el periodo de administración de antarelix a los grupos experimentales.

Al considerar por separado las concentraciones de progesterona de las yeguas con gestación mular que abortaron después de ser tratadas con antarelix y las de aquellas que no abortaron al recibir el tratamiento (figura 3), se advierte que los animales que no abortaron tuvieron desde el inicio y durante todo el estudio concentraciones de eCG significativamente mayores ($p < 0.05$) que las del grupo de yeguas testigo con gestación mular. En cambio, las yeguas que si abortaron tuvieron desde la semana 7 a la 10 concentraciones de eCG significativamente menores a las de las yeguas testigo ($p < 0.05$). Desde la semana 7 hasta el final del estudio las concentraciones de eCG de las yeguas que abortaron fueron significativamente menores a las de las yeguas que no abortaron ($p < 0.01$).

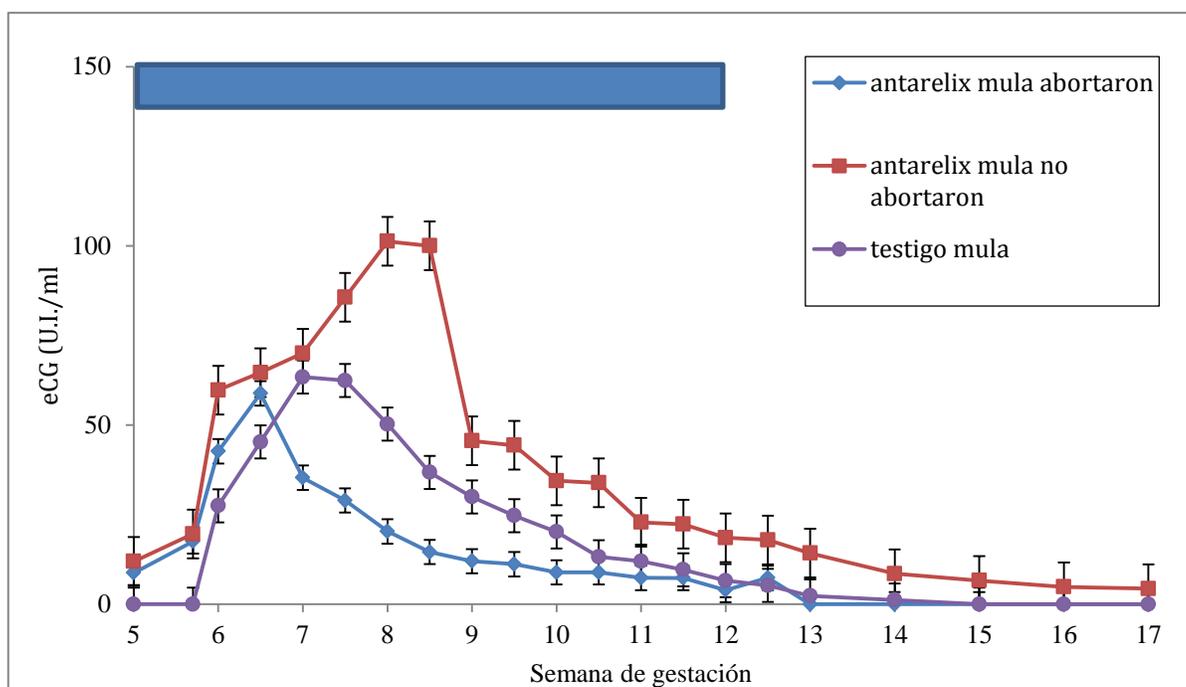


Figura 3. Concentraciones de eCG en yeguas con gestación mular que abortaron o que no abortaron al ser tratadas con anatrelix a razón de 0.01mg/kg/día, utilizando como referencia al grupo de yeguas testigo (no tratadas) con gestación mular. Las concentraciones promedio de eCG de las yeguas que no abortaron fueron significativamente mayores a los de las yeguas testigo ($p<0.05$) y a los de las yeguas que si abortaron ($p<0.05$). La barra sólida horizontal indica el periodo de administración de antarelix a los grupos experimentales.

6.4 Concentraciones de progesterona

Las concentraciones de progesterona fueron afectados en forma significativa ($p<0.01$) por el tipo de gestación y por las interacciones entre tipo de gestación y tratamiento y entre tipo de gestación y semana de gestación. En la figura 4 se muestran las concentraciones promedio de progesterona, las cuales inicialmente eran similares en todos los grupos. Sin embargo, a partir de la semana 8 en los grupos con gestación equina las concentraciones se elevaron mientras que en los grupos con gestación mular empezaron a disminuir. Como resultado, las concentraciones promedio durante el estudio fueron significativamente mayores ($p<0.01$) en los grupos con gestación equina que en los de gestación mular, independientemente del tratamiento que recibieron.

En el caso de las gestaciones equinas, las concentraciones de progesterona se elevaron más rápidamente entre la semana 8 y 9 en las yeguas tratadas con antarelix que en el grupo testigo (figura 4). Posteriormente, en ambos grupos las concentraciones de progesterona se mantuvieron a niveles relativamente constantes durante el resto del estudio, manteniéndose siempre más elevadas las concentraciones del grupo antarelix que las del grupo testigo, por lo que las concentraciones promedio durante el estudio fueron significativamente mayores en las yeguas tratadas con el antagonista de GnRH ($p<0.01$)

En las yeguas con gestación mular el tratamiento con antarelix provocó una pronunciada caída en las concentraciones de progesterona entre las semanas 6 y 8 de la gestación, lo cual no ocurrió en las yeguas testigo. Posteriormente en ambos grupos se registró una gradual y constante disminución en las concentraciones de progesterona durante el resto del estudio, manteniéndose siempre menores concentraciones en las hembras tratadas, por lo que las concentraciones promedio del grupo tratado con antarelix durante el estudio fueron menores que las del grupo testigo ($p<0.01$).

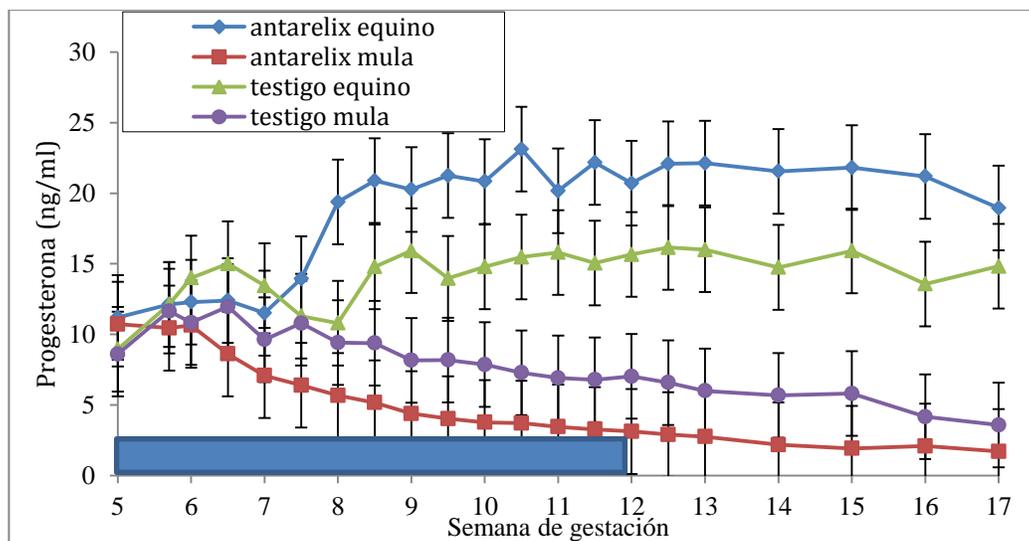


Figura 4. Concentraciones de progesterona en yeguas con gestación equina o mular tratadas (antarelix) o no (testigo) con un antagonista de GnRH a razón de 0.01mg/kg/día. Las concentraciones promedio de progesterona de cada grupo durante el estudio fueron significativamente diferentes a las de cualquier otro grupo ($p<0.05$). La barra sólida horizontal indica el periodo de administración de antarelix a los grupos experimentales.

Al evaluar por separado las concentraciones de progesterona de las yeguas con gestación mular que abortaron al ser tratadas con antarelix contra las yeguas con gestación mular que no abortaron al recibir el tratamiento y contra las yeguas testigo (no tratadas) con el mismo tipo de gestación (figura 5), se observa que las yeguas tratadas que no abortaron mantuvieron en todo momento concentraciones de progesterona similares a las de las yeguas testigo, mientras que en las yeguas que abortaron las concentraciones de progesterona comenzaron a disminuir en forma marcada a partir de la semana 6 de gestación, siendo significativamente menores ($p < 0.01$) a las de los otros grupos a partir de ese momento.

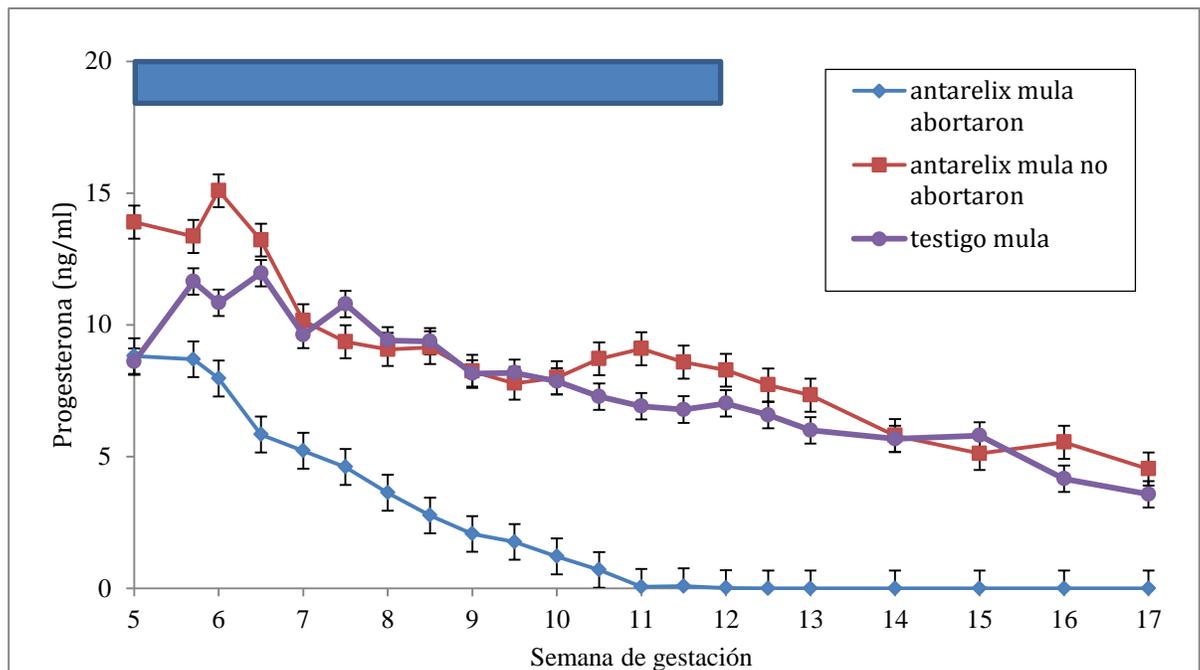


Figura 5. Concentraciones de progesterona en yeguas con gestación mular que abortaron o que no abortaron al ser tratadas con antarelix a razón de 0.01mg/kg/día, utilizando como referencia al grupo de yeguas testigo (no tratadas) con gestación mular. Las concentraciones promedio de progesterona de las yeguas que abortaron fueron significativamente menores que los de las yeguas que no abortaron (ambas de grupo antarelix) y que los de las yeguas testigo con el mismo tipo de embrión ($p < 0.01$). Las diferencias entre las yeguas tratadas que no abortaron y las yeguas testigo no son significativas ($p > 0.05$).

6.5 Diámetro de los cuerpos lúteos primarios

En la figura 6 se observa que el diámetro del CL primario de las yeguas con gestación mular tratadas con antarelix disminuyó rápidamente a partir de la semana 6, siendo significativamente distinto al del resto de los grupos ($p < 0.01$). En las yeguas gestantes con equino tratadas con antarelix los diámetros promedio del CL primario fueron ligeramente inferiores a los de las yeguas testigo hasta la semana 12, pero se redujeron muy rápidamente a partir de este momento, siendo significativamente distintos a los de las yeguas testigo después de la semana 13 ($p < 0.05$). No existieron diferencias en el diámetro promedio del cuerpo lúteo primario entre las yeguas testigo con distinto tipo de gestación ($p > 0.05$), aunque a partir de la semana 11 los diámetros de las yeguas con gestación mular siempre fueron ligeramente menores a los de las yeguas con gestación equina.

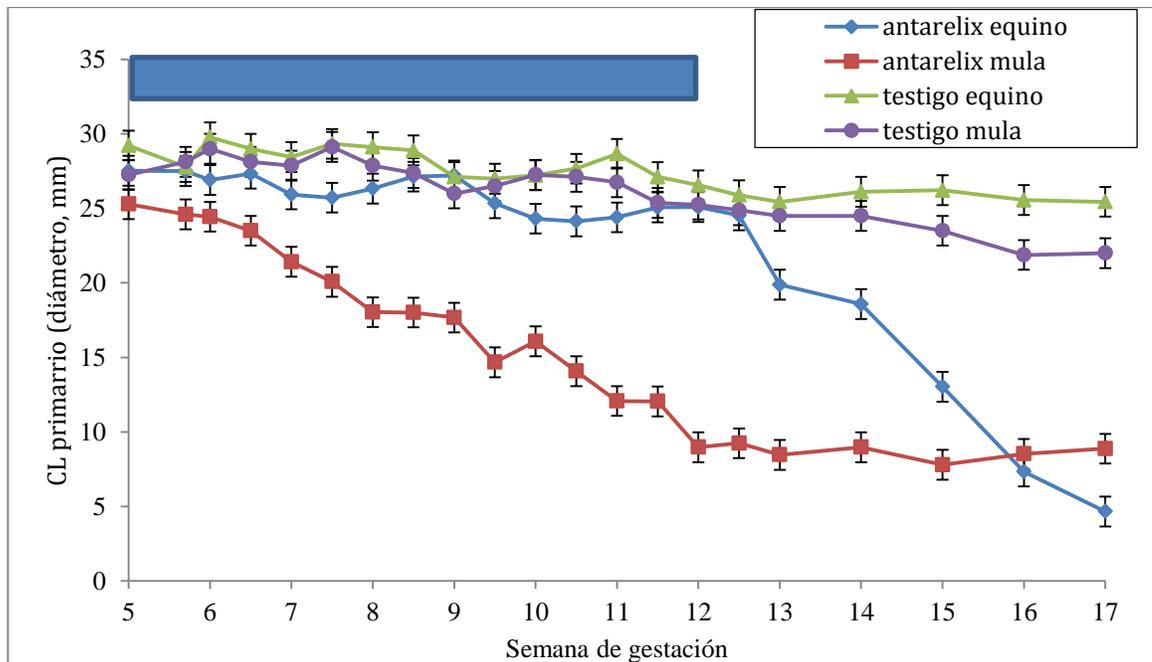


Figura 6. Diámetro del cuerpo lúteo primario en yeguas con gestación equina y mular tratadas (antarelix) o no (testigo) con un antagonista de GnRH a razón de 0.01mg/kg/día. Los diámetros promedio del grupo antarelix con gestación mular fueron significativamente diferentes a los de los otros tres grupos ($p < 0.05$). Los diámetros promedio del grupo antarelix con gestación equina fueron significativamente diferentes a los de los grupos testigo después de la semana 13 ($p < 0.05$). La barra sólida horizontal indica el periodo de administración de antarelix.

6.6 Diámetro de los cuerpos lúteos secundarios

Solo dos yeguas con gestación equina tratadas con antarelix presentaron cuerpos lúteos secundarios, y solo una yegua con gestación mular tratada con antarelix tuvo ovulación secundaria, por lo que en estos dos grupos el número de animales que contribuyeron al cálculo del diámetro de los cuerpos lúteos secundarios es insuficiente para realizar un análisis estadístico. Aun así vale la pena mencionar que el diámetro del único cuerpo lúteo secundario formado en gestación mular tratadas con antarelix fue siempre considerablemente menor a los diámetros promedio en todos los otros grupos (figura 7). En las gestaciones equinas tratadas con antarelix el diámetro de los cuerpos lúteos secundarios es similar al de los grupos testigo.

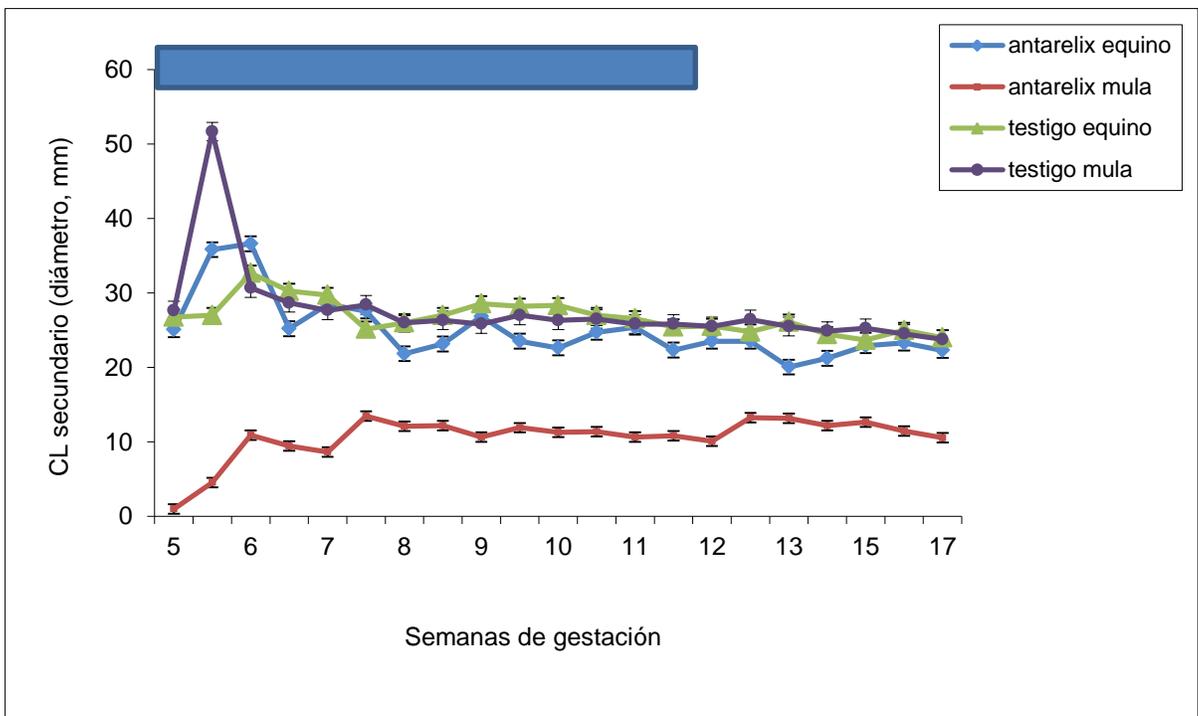


Figura 7. Diámetro de los cuerpos lúteos secundarios en yeguas con gestación equina y mular tratadas o no con antarelix a razón de .01 mg/kg/día. La barra sólida horizontal indica el periodo de administración de antarelix a los grupos experimentales.

6.7 Cuerpos lúteos accesorios formados a partir de folículos hemorrágicos anovulatorios

El volumen de los folículos hemorrágicos anovulatorios fue significativamente mayor en gestaciones equinas que en gestaciones mulares ($p < 0.01$). La diferencia entre los dos tipos de gestación fue tan grande que para esta variable se muestran dos gráficas con diferente escala. En la primera (figura 8) se presenta el volumen de folículos hemorrágicos anovulatorios de las yeguas gestadas con caballo y en la segunda gráfica (figura 9) se muestran los dos grupos de yeguas gestadas con burro.

En las gestaciones equinas se comenzaron a formar folículos hemorrágicos anovulatorios entre la séptima y la octava semana de gestación. Sin embargo, el tratamiento con antarelix ejerció un importante efecto sobre la formación de las glándulas lúteas accesorias, ya que como se puede observar en la figura 8 el volumen total de FHAs fue significativamente mayor en este grupo que en el testigo entre la séptima y novena semana de gestación ($p < 0.01$).

Por otra parte en el grupo con gestación mular tratado con antarelix no se formaron folículos hemorrágicos anovulatorios ni cuerpos lúteos accesorios, mientras que en el grupo testigo con gestación mular solamente se formaron después de la semana 11 de la gestación (figura 9). Debe notarse que los FHAs que se formaron en el grupo testigo con gestación mular alcanzaron volúmenes significativamente menores ($p < 0.01$) a los de las gestaciones equinas (4 veces menores que en las yeguas testigo con gestación equina y entre 10 y 30 veces menores que en las yeguas con gestación equina tratadas con antarelix).

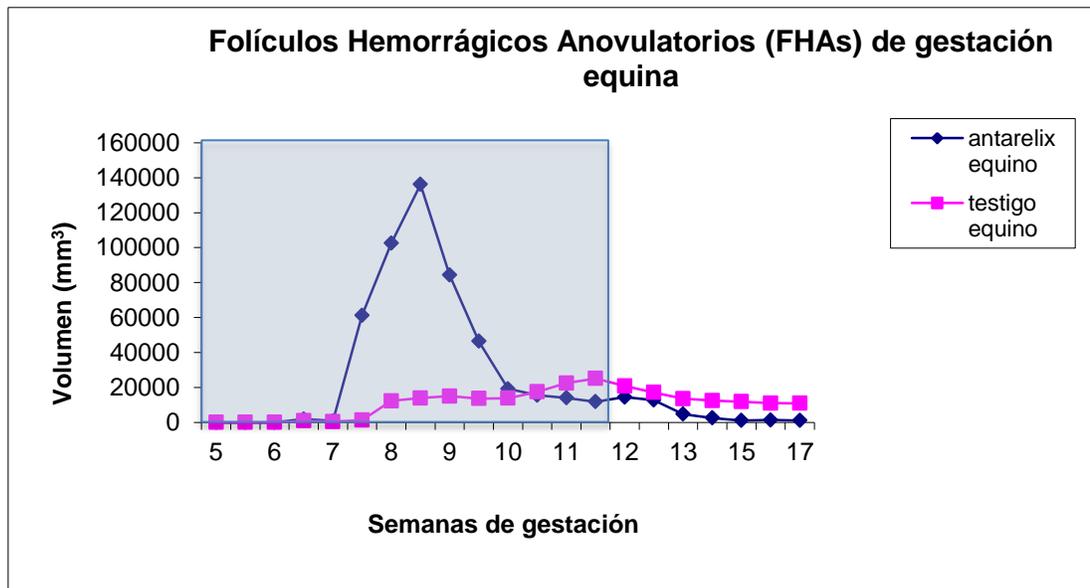


Figura 8. Volumen total de folículos hemorrágicos anovulatorios en yeguas con gestación equina tratadas o no con un antagonista de GnRH a razón de 0.01mg/kg/día. El área sombreada representa el periodo de administración de antarelix en los grupos experimentales. El volumen promedio de los FHAs de las yeguas experimentales con gestación equina fue significativamente mayor al de los otros grupos ($p < 0.05$).

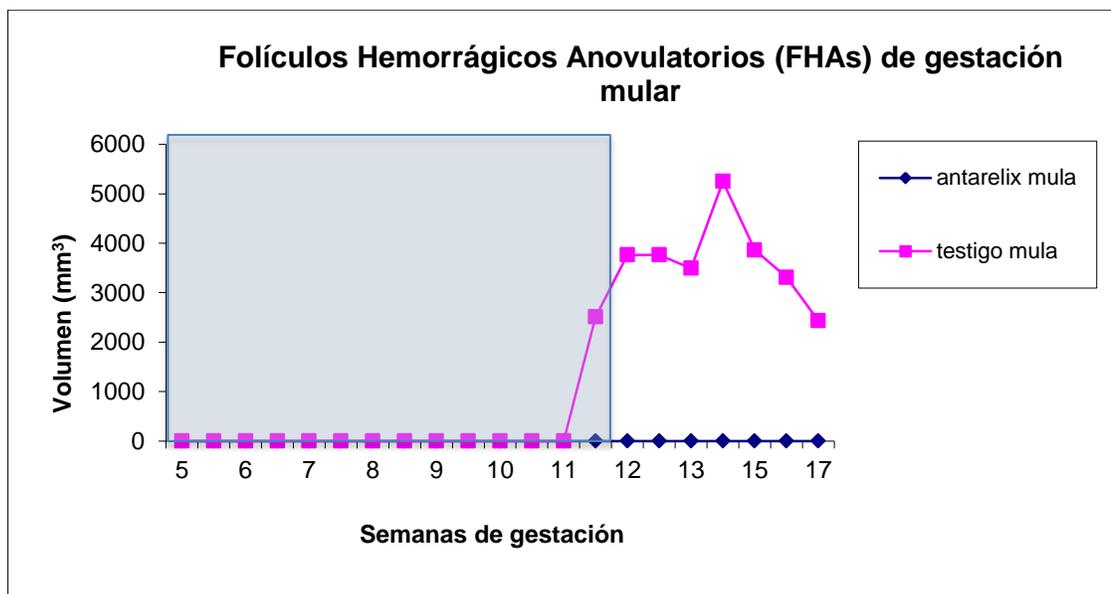


Figura 9. Volumen total de folículos hemorrágicos anovulatorios en yeguas con gestación mular tratadas o no con un antagonista de GnRH a razón de 0.01mg/kg/día. El área sombreada representa el periodo de administración de antarelix en los grupos experimentales.

7. DISCUSIÓN

7.1 Concentraciones de eCG

Los resultados del presente trabajo son consistentes con los trabajos previos en los que se ha demostrado que las concentraciones de eCG son mucho menores durante las gestaciones de yegua servida con burro que en las de yegua preñada con caballo y que la deficiencia relativa de eCG en gestaciones mulares también resulta en menores concentraciones de progesterona entre los 40 y los 120 días de la gestación. (Boeta y Zarco, 2005; 2010; 2012). Por otra parte, en el presente trabajo se encontró que la secreción de eCG no es afectada por la administración de un antagonista de GnRH, lo que era esperado debido a que la eCG se secreta en forma constitutiva por las copas endometriales, y su secreción no está sujeta ni a un control hipotalámico ni a la retroalimentación negativa por esteroides sexuales (Murphy y Martinuk, 1991).

Por otra parte, en trabajos anteriores se ha encontrado que dentro de cada tipo de gestación (mular o equina) existe variabilidad individual en las concentraciones de eCG y que algunas yeguas tienen concentraciones relativamente elevadas de esta hormona a pesar de estar gestantes con producto mula (Boeta y Zarco 2005, 2010, 2012). Esta variación individual también se presentó en el presente trabajo. Cabe destacar que en todas las gestaciones mulares de este trabajo se utilizó el mismo burro como semental, por lo que las diferencias en la secreción de eCG no pueden atribuirse a un efecto paterno, sino a diferencias maternas o, en todo caso, a una diferente interacción entre el genotipo materno (distinto en cada yegua) con respecto a un genotipo paterno constante para todas las gestaciones mulares, lo que es respaldado por el hecho de que en cada uno de los trabajos en los que anteriormente se han encontrado gestaciones mulares con concentraciones de eCG relativamente elevadas (Boeta y Zarco, 2005; 2012; 2012) también se utilizó un solo burro para lograr todas las gestaciones.

Ginther (1992) menciona que en gestaciones equinas la producción de la eCG es una característica heredable y que la contribución materna al genoma del feto afecta los niveles de eCG en la circulación materna, y sugiere que esto haría posible seleccionar animales con una mayor capacidad de producción de eCG. Sin embargo, existen otros motivos por los cuales las concentraciones de eCG pueden variar entre animales, por ejemplo, las yeguas que se gestan en el primer estro posparto tienen mayores concentraciones de eCG, de igual manera las yeguas de tres o más partos producen mayores cantidades de eCG que las primíparas, lo que posiblemente es debido a diferencias en tamaño del útero y en la superficie de interacción coriónica-endometrial en el momento de la invasión del cinturón trofoblástico (Ginther, 1992; Allen y Wilsher, 2009).

7.2 Pérdidas de la gestación y su relación con las concentraciones hormonales

En el presente trabajo no se produjeron pérdidas de gestación en las yeguas testigo con gestación mular. Esto difiere con respecto a los resultados de trabajos anteriores, en los que se registraron incidencias de aborto del 30 al 37 % en este tipo de gestación (Boeta y Zarco, 2005; 2010). La ausencia de abortos en las gestaciones mulares testigo del presente experimento puede haberse debido a variabilidad aleatoria y al número relativamente bajo de yeguas testigo gestantes con embrión mula (8 animales) estudiadas en el presente estudio, que contrasta con las 19 (Boeta y Zarco, 2005) y 32 (Boeta y Zarco, 2010) gestaciones mulares estudiadas anteriormente, aunque si asumimos que la incidencia real de pérdidas de gestación en preñeces mulares es del 30 %, existiría solamente una probabilidad del 6 % de que en un grupo de 8 yeguas con gestación mular no se presente ningún aborto (Freund, 1970).

Es importante mencionar que en el presente estudio no se midió la LH hipofisiaria, la cual es una variable indispensable para observar el efecto del antagonista de GnRH, por lo que no podemos confirmar que el antarelix actuó con éxito y solo podemos suponer que hubo una inhibición de LH como lo ha comprobado Guillaume y Briant (2003) en estudios

anteriores con el uso de antarelix en yeguas y guiádonos solo en base a los resultados obtenidos de las demás variables que se midieron.

El tratamiento con antarelix en yeguas con gestación mular resultó en una fuerte afectación a la viabilidad fetal, ya que abortaron el 62.5% de los animales de este grupo (5/8), siendo esta incidencia significativamente mayor ($p < 0.05$) a la encontrada en el grupo testigo con gestaciones mulares. Las pérdidas fetales que se registraron en las yeguas tratadas con antarelix ocurrieron después de la semana 6 de gestación y fueron precedidas por una caída en las concentraciones de progesterona aparentemente provocada por la falta de apoyo gonadotrópico que se produjo cuando el antarelix posiblemente inhibió la secreción de LH hipofisiaria (Guillaume et al, 2002; Briant et al, 2003) en yeguas que además tenían concentraciones bajas de eCG debido a su gestación de tipo mular. Este concepto es apoyado por el hecho de que las yeguas que abortaron durante el tratamiento con antarelix fueron en su mayoría las yeguas con menores concentraciones de eCG dentro del grupo con gestaciones mulares, aunque hubo una excepción (figura 13). En cambio, dos de las tres yeguas con gestación mular que no abortaron a pesar de ser tratadas con antarelix fueron animales cuya secreción de eCG era considerablemente más elevada que la promedio para gestaciones mulares. El hecho de que las concentraciones de eCG en las yeguas con gestación mular y tratadas con antarelix fueron significativamente menores en las hembras que abortaron comparadas con aquellas que no abortaron, sugiere que en yeguas con concentraciones muy bajas de eCG la secreción hipofisiaria de LH es necesaria para mantener la gestación, pero que una vez que se supera cierto umbral de eCG esta hormona es suficiente para mantener la función lútea y la gestación aún cuando se suprime la secreción de LH como posiblemente sucedió en este estudio. Por otra parte, la ausencia de abortos en el grupo de yeguas testigo (en las que no se suprimió la secreción de LH) con gestación mular, confirma lo sugerido por Boeta y Zarco (2010) en el sentido de que en yeguas con concentraciones bajas de eCG la secreción de LH hipofisiaria colabora para mantener la función lútea y la gestación.

Boeta y Zarco (2005, 2010) concluyeron que el umbral de progesterona necesario para mantener la gestación es considerablemente bajo, lo que permite mantener la gestación en la mayoría de las gestaciones mulares. Sin embargo, también encontraron diversos casos en los que una caída por debajo de ese umbral desemboca en el aborto. El comportamiento de las concentraciones de progesterona en las yeguas que abortaron en el presente trabajo indica que el tratamiento con antarelix en yeguas con bajas concentraciones de eCG (gestación mular) resulta en una baja en las concentraciones de progesterona por debajo del nivel necesario para mantener la gestación, por lo que en algunas gestaciones mulares la secreción hipofisiaria de LH puede hacer la diferencia entre el aborto y el mantenimiento de la gestación.

En el caso de las gestaciones equinas el tratamiento con antarelix no afectó la gestación debido a que las yeguas con este tipo de gestación cuentan con suficiente apoyo luteotrópico aportado por las altas concentraciones de eCG características de las gestaciones equinas, por lo que la posible supresión de la secreción de LH mediante la administración de antarelix no resultó en una caída en las concentraciones de progesterona e inclusive, por las razones que se analizarán más tarde, provocó una elevación en las concentraciones de dicha hormona. Como ya se mencionó, la hipótesis de que la eCG es capaz de mantener la función lútea y la gestación en yeguas en las que se inhibe la secreción de LH con un antagonista de GnRH es apoyada por el hecho de que dos de las únicas tres yeguas con gestación mular que no abortaron durante el tratamiento con antarelix tenían concentraciones de eCG considerablemente más elevadas de lo normal para una gestación mular, lo que les permitió mantener concentraciones de progesterona similares a las de las yeguas con gestación mular que no recibieron tratamiento con antarelix.

Solamente una yegua con gestación mular tratada con antarelix no abortó a pesar de tener concentraciones de eCG considerablemente más bajas de lo normal, así como concentraciones de progesterona y diámetros del cuerpo lúteo primario ligeramente por debajo del promedio para gestaciones mulares (figura 17). Las concentraciones de eCG de

esta yegua eran muy bajas, y debe asumirse que en esta yegua el antarelix debe haber suprimido la secreción de LH (Guillaume et al, 2002; Briant et al, 2003). Sin embargo, ni sus concentraciones de progesterona ni el diámetro de su cuerpo lúteo primario mostraron una caída tan importante como las registradas en las yeguas que abortaron, por lo que se desconoce cuál puede haber sido su fuente de soporte lúteo, o si podría haber existido algún tipo de resistencia al antagonista de GnRH. Esta yegua en particular ha demostrado en trabajos anteriores tener una capacidad fuera de lo común para mantener la gestación incluso con bajas concentraciones tanto de P4 como de eCG, e incluso ha sido capaz de formar cuerpos lúteos accesorios en ausencia de niveles detectables de eCG (Boeta, 2008). En el pasado se han descrito otras yeguas con estas características, como la yegua “491” descrita por Boeta y Zarco (2005) y otros casos mencionados por Allen et al (1987), pero el presente trabajo es el primero en el que se demuestra que animales como este pueden mantener la gestación y concentraciones relativamente normales de progesterona no solamente en ausencia de eCG, sino también cuando tienen ausencia simultánea de eCG y posiblemente de LH, por lo que sería interesante estudiar con más detalle las características de este tipo de animal. Una posibilidad sería que se tratara de yeguas que desarrollan en forma muy temprana la capacidad de producir progestágenos en la placenta. Otra alternativa sería que los cuerpos lúteos de algunas yeguas pudieran tener la capacidad de funcionar en ausencia de gonadotropinas, como se ha demostrado en ovejas a las que se les suprime la secreción de LH (McNeilly et al, 1992).

7.3 Ovulaciones durante la gestación y formación de cuerpos lúteos secundarios

Como ya se mencionó, en el caso de gestaciones mulares las concentraciones de P4 fueron significativamente menores en el grupo tratado con antarelix que en el grupo testigo a pesar de que las concentraciones de eCG fueron prácticamente idénticas en ambos grupos. La diferencia en las concentraciones de progesterona entre gestaciones mulares tratadas o sin tratar con antarelix se generaron durante las primeras 2 semanas de administración del antagonista de GnRH (semanas 5 al 7.5), cuando se registró una caída en las concentraciones de progesterona en el grupo tratado mientras que en el testigo se estaba

registrando una leve elevación en las concentraciones de progesterona asociada tanto con la breve resurgencia del cuerpo lúteo primario que ocurre en gestaciones mulares precisamente durante este periodo (Boeta y Zarco 2012), como con la ovulación secundaria que en el presente trabajo se presentó en todas las yeguas testigo con gestación mular (cuadro 1).

Durante las gestaciones equinas (yeguas servidas con caballo), generalmente se produce una ovulación y se forma un cuerpo lúteo secundario entre el día 35 y el día 45 de la gestación (Squires et al., 1974; Boeta y Zarco, 2012). Bergfelt et al. (1989) encontraron que el primer cuerpo lúteo secundario se forma aproximadamente al mismo tiempo que comienza la secreción de eCG (día 40), por lo que sugirieron que el inicio de la secreción de eCG es el factor determinante para que se produzca la primera ovulación de la gestación. Boeta y Zarco (2012) encontraron que la pequeña elevación de eCG que se produce entre las semanas 5 y 7 en gestaciones mulares es en la mayoría de las yeguas suficiente para que se manifiesten sus efectos luteogénicos, por lo que prácticamente todas las yeguas con gestación mular tienen una ovulación secundaria alrededor de la semana 7 de gestación a pesar de tener concentraciones de eCG muy reducidas. Ellos sugirieron que esto podría ser debido a la alta concentración de receptores para LH/eCG presentes en esta etapa de la gestación, lo que permitiría a la eCG actuar a pesar de sus bajas concentraciones. Sin embargo, los resultados del presente estudio sugieren que en realidad en gestaciones mulares solamente se puede producir una ovulación secundaria con la ayuda de secreción de LH hipofisiaria, por lo que no ocurrieron ovulaciones secundarias en 7 de las 8 yeguas con gestaciones mulares tratadas con antarelix, en las que el bloqueó competitivo de los receptores de GnRH evita la estimulación por la GnRH endógena y ocasiona una inhibición inmediata de la liberación de LH (Halmos et al., 1996; Watson et al, 2000; Duijkers et al, 1998; Ragni et al., 2001). En cambio, todas las yeguas con gestación mular que no recibieron antarelix tuvieron una ovulación secundaria.

La secreción de LH hipofisiaria podría ser importante para que se produzca una ovulación secundaria aún en gestaciones equinas, que transcurren con altos niveles de eCG, ya que en

este trabajo solamente el 22 % de las yeguas con gestación equina tratadas con antarelix presentaron una ovulación secundaria, lo que fue significativamente menor al 100% presentado por las yeguas testigo con el mismo tipo de gestación (cuadro 1). Esto podría explicar por qué en las gestaciones equinas que ocurren fuera de la época reproductiva, cuando la secreción de LH se reduce (Hart et al, 1984) se forman menos cuerpos lúteos suplementarios que en las gestaciones que se desarrollan en plena época reproductiva (Allen, 1982; Allen, 1984).

7.4 Cuerpos lúteos accesorios y concentraciones de progesterona

En las yeguas con gestación mular tratadas con antarelix no se formaron cuerpos lúteos accesorios, lo cual es el resultado de la completa supresión del desarrollo folicular que ocurre en estos animales como consecuencia de la ausencia simultánea de eCG y LH (Costilla, 2011). En estas yeguas la ausencia de cuerpos lúteos secundarios, de cuerpos lúteos accesorios y de efectos luteotrópicos sobre el cuerpo lúteo primario resultó en concentraciones de progesterona en todo momento menores ($p < 0.05$) a las de las yeguas con gestación mular que no fueron tratadas con antarelix, todas las cuales formaron un cuerpo lúteo secundario y varias de ellas formaron cuerpos lúteos accesorios, lo que indica que la presencia de LH puede ser suficiente para que se produzca una ovulación secundaria durante el breve periodo en que la eCG está elevada en gestaciones mulares, y puede en algunos casos permitir la formación de cuerpos lúteos accesorios en momentos posteriores aún en ausencia de eCG.

En el caso de gestaciones equinas, el grupo experimental mostró concentraciones más altas de P4 que el grupo testigo a partir de la semana 8 de la gestación (figura 4). Este efecto aparentemente paradójico, en el que la supresión de la secreción de una hormona luteotrópica (LH) resultó en una mayor producción de progesterona, se debió muy probablemente al gran número de glándulas lúteas accesorias que se presentaron a partir de la semana 7 de la gestación en las yeguas tratadas con antarelix. Las altas concentraciones de eCG típicas de las gestaciones equinas posiblemente junto con la FSH ya que se sabe de

la poca susceptibilidad de dicha hormona al bloqueo por un antagonista de GnRH (McNeilly et al., 1992) y que tiene un patrón bimodal aún en yeguas gestantes, provocaron el desarrollo de folículos de tipo preovulatorio, pero el posible bloqueo a la secreción de LH provocado por la administración de antarelix evitó que se produjera la ovulación, lo que resultó en la formación de FHAs que terminaron transformándose en una gran cantidad de cuerpos lúteos accesorios de gran volumen, que se sabe producen cantidades de progesterona mayores que las producidas por cuerpos lúteos normales (Bergfelt y Adams, 2007) En este sentido, estudios realizados por Acosta et al., (2004) durante la época de transición otoñal en yeguas vacías muestran que el desarrollo de un folículo dominante anovulatorio y su transformación en FHAs se produce cuando la época del año provoca deficiencias relativas de LH que llevan a una reducción en el flujo sanguíneo y en las concentraciones de factores de crecimiento, especialmente la VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) del líquido folicular. De esta manera, los resultados del presente estudio sugieren que en yeguas con gestación equina tratadas con antarelix la eCG provocó un marcado desarrollo folicular pero no fue capaz de provocar la ovulación ni su rápida luteinización, por lo que se formaron FHAs. Posteriormente los efectos luteogénico y luteotrópico de la eCG actuaron sobre los FHAs transformándolos en glándulas lúteas accesorias con alta capacidad de producción de progesterona. En cambio, en las yeguas testigo con gestación equina la estimulación del desarrollo folicular provocada por la eCG culminó en la ovulación y/o rápida luteinización de cuerpos lúteos accesorios de volumen normal, cuya producción de progesterona no fue tan elevada como la de las yeguas tratadas con antarelix.

La elevación en las concentraciones de progesterona que ocurrió en el presente trabajo durante gestaciones equinas de yeguas tratadas con antarelix contrasta con los efectos del antarelix en yeguas vacías, en las que la administración de antarelix resulta en una disminución en las concentraciones de progesterona (Watson et al, 2000; Briant et al, 2003). Evidentemente la diferencia entre yeguas vacías y yeguas con gestación equina consiste en la presencia de altas concentraciones de eCG en las yeguas gestantes, que provoca el desarrollo de FHAs y su posterior transformación en cuerpos lúteos accesorios.

La necesidad de elevadas concentraciones de eCG para estimular un desarrollo folicular suficiente para formar folículos hemorrágicos anovulatorios también explicaría el porqué en el presente trabajo la administración de antarelix en gestaciones mulares no provocó el desarrollo de FHAs ni de cuerpos lúteos accesorios.

En forma natural la formación de glándulas lúteas suplementarias en gestaciones mulares es menor que en gestaciones equinas debido a las diferencias en la secreción de eCG entre ambos tipos de gestación. Sin embargo el efecto del antarelix sobre el desarrollo de cuerpos lúteos accesorios fue muy distinto en ambos tipos de gestación, ya que en las gestaciones mulares suprimió totalmente su formación, mientras que en las gestaciones equinas provocó el desarrollo de un gran número de FHAs que terminaron transformándose en cuerpos lúteos accesorios de gran tamaño. Desde el punto de vista endócrino el resultado fue que en las gestaciones mulares la administración de antarelix provocó una disminución en las concentraciones de progesterona mientras que en las gestaciones equinas el mismo tratamiento resultó en un aumento muy significativo en las concentraciones de progesterona.

8. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo sugieren que la eCG por sí sola (en ausencia de LH), y aún en concentraciones bajas, proporciona suficiente soporte luteotrópico sobre el cuerpo lúteo primario para mantenerlo funcional, pero tiene una pobre capacidad de inducir la ovulación, por lo que las ovulaciones secundarias no se presentan en gestaciones mulares tratadas con antarelix y su incidencia se reduce en gestaciones equinas tratadas con el antagonista de GnRH.

La LH también parece indispensable para que en etapas posteriores de la gestación se produzca la ovulación y/o la rápida luteinización de los folículos dominantes que se desarrollan durante la gestación, por lo que su supresión por la administración de antarelix en gestaciones equinas resulta en la formación de FHAs que posteriormente se transforman en cuerpos lúteos accesorios con gran capacidad de producción de progesterona, lo que indica que la eCG por sí sola es capaz de inducir la luteinización gradual de cuerpos lúteos accesorios y posteriormente estimular su producción de progesterona, pero no de inducir su ovulación o una rápida luteinización. Sin embargo, el desarrollo de folículos dominantes suficientemente desarrollados para transformarse en cuerpos lúteos accesorios requieren de la presencia de concentraciones suficientes de eCG, por lo que se bloquea completamente en gestaciones mulares tratadas con antarelix.

Se concluye que la presencia de eCG durante la gestación de la yegua estimula el desarrollo folicular, permite la luteinización gradual de folículos desarrollados y tiene efectos luteotrópicos sobre cuerpos lúteos accesorios. Sin embargo, se requiere LH para que se produzcan ovulaciones secundarias o para que se produzca una rápida luteinización de folículos dominantes durante la gestación equina. Es necesaria la presencia tanto de FSH como LH junto con la eCG para que se produzca el patrón de desarrollo folicular, ovulaciones secundarias y formación rápida de cuerpos lúteos accesorios a partir de folículos dominantes característico de las gestaciones equinas normales, por lo que los efectos de LH y eCG, aunque muestran un cierto grado de redundancia o sinergia, son

también lo suficientemente distintos para ser considerados como complementarios y evolutivamente ventajosos.

9. ANEXO

9.1 Descripción de los casos de yeguas con gestación mular tratadas con antarelix que perdieron la gestación

Debido a que el tratamiento con antarelix en gestaciones mulares resultó en pérdida de gestación en algunos casos pero no en otros, a continuación se describirá el comportamiento endocrino de los individuos representativos que perdieron la gestación comparándolos contra los promedios del grupo testigo, con el objeto de identificar las posibles causas de la diferencia en susceptibilidad al tratamiento entre individuos. En las figuras se comparan individualmente los valores de progesterona, y eCG de las yeguas con gestación mular que sufrieron pérdida de la gestación contra los valores promedio de su grupo testigo (yeguas con gestación mular que no recibieron tratamiento con antarelix).

En la yegua “Manchitas” (figura 10) las concentraciones de progesterona se encontraban muy bajas (2.9 ng/ml) desde el primer muestreo en la semana 5 de la gestación y la eCG nunca se elevó. Las concentraciones de progesterona, que ya venían bajando, llegaron a niveles basales en forma coincidente con el aborto. Se detectó muerte fetal en la semana 6 de la gestación por la ausencia de latido cardíaco y cambios en las membranas fetales característicos de pérdida fetal. Podría pensarse que en esta yegua la ausencia tanto de eCG como de LH (suprimida por el antarelix) provocó un cese inmediato de la función lútea. Sin embargo, el hecho de que las concentraciones de progesterona eran muy bajas desde la primera muestra no permite eliminar la posibilidad de que la falla lútea tuvo un origen anterior al tratamiento con antarelix, posiblemente asociado a la total ausencia de eCG en esta yegua.

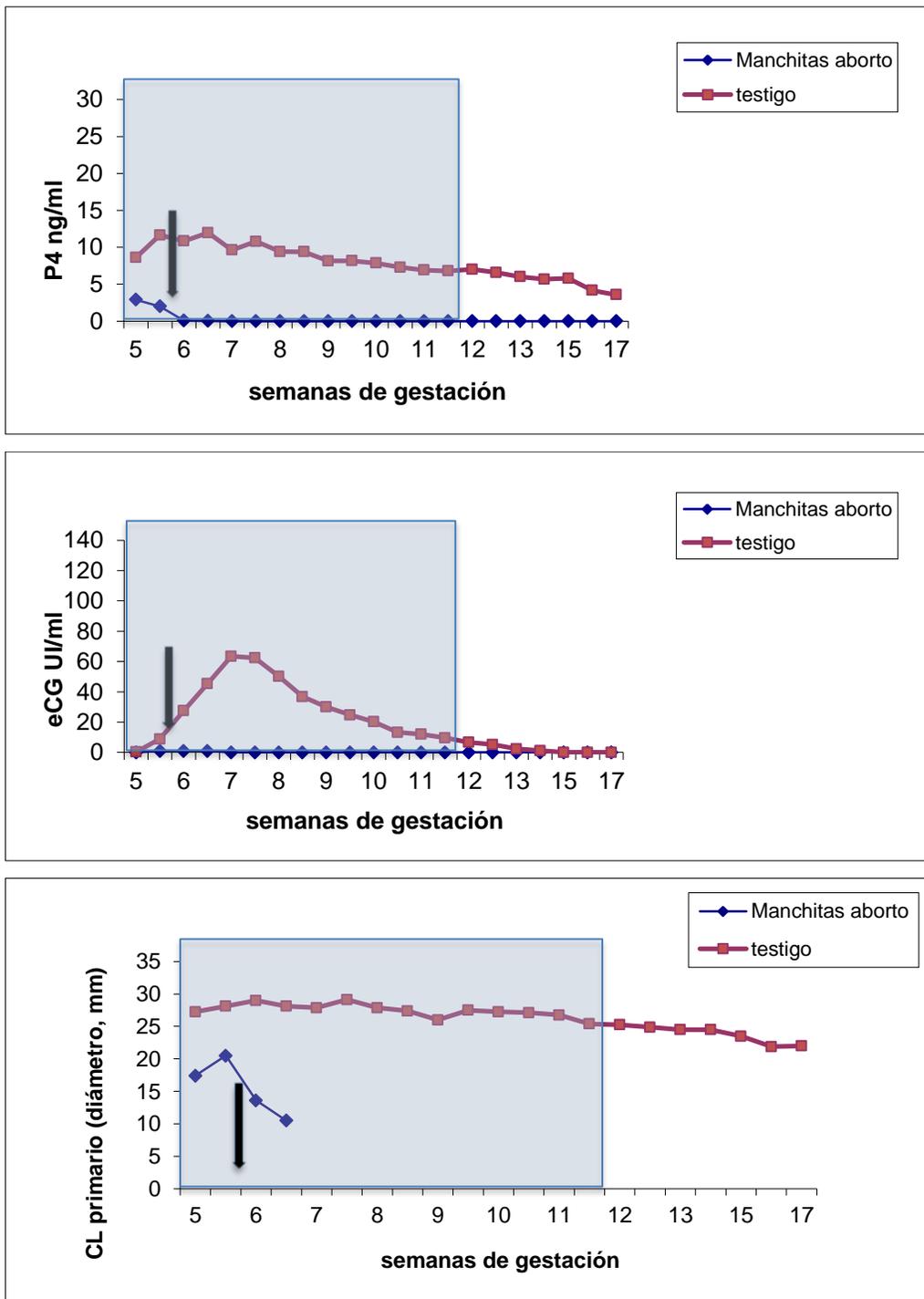
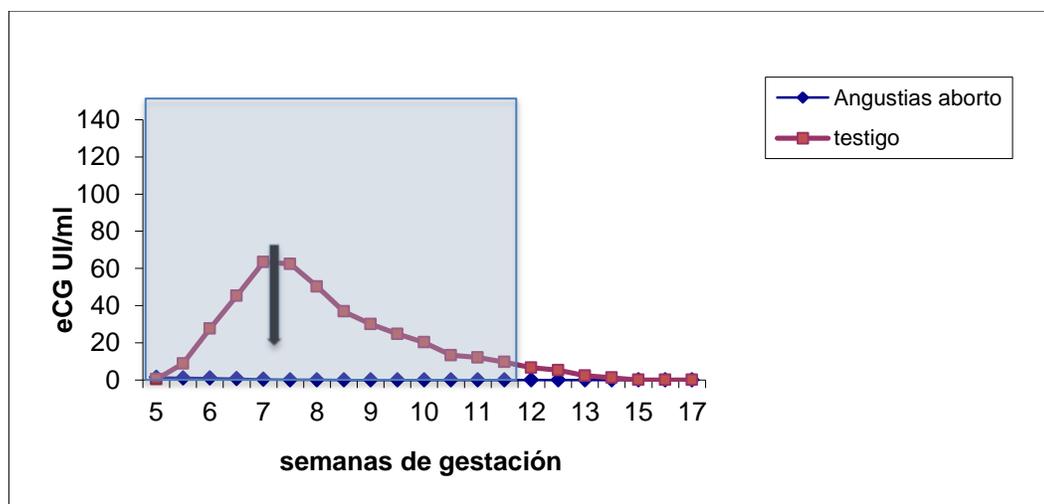
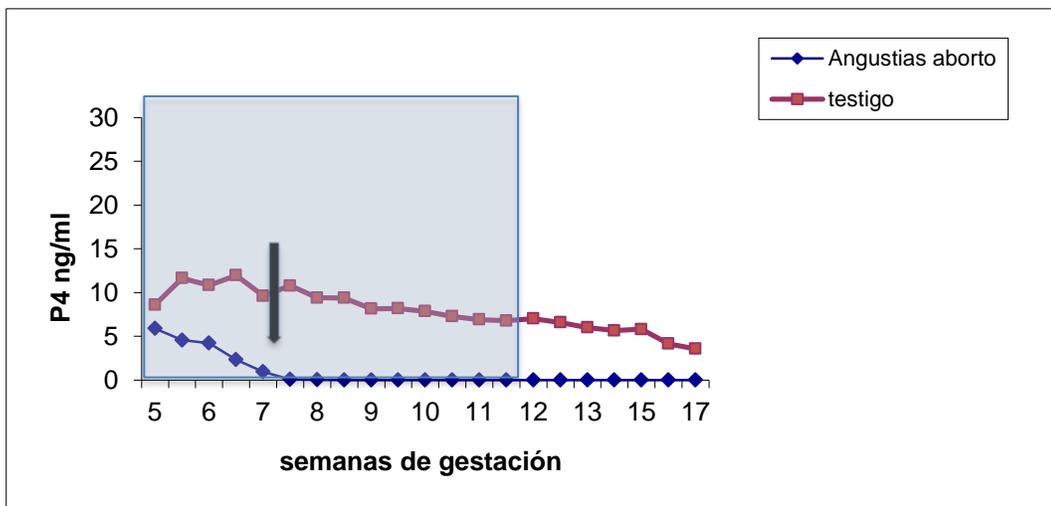


Figura 10. Concentraciones de progesterona, eCG y diámetro del cuerpo lúteo primario en una yegua con gestación mular que sufrió mortalidad fetal por aparente deficiencia lútea primaria. Las flechas indican el momento en que se registró la muerte fetal. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.

En la yegua “Angustias” (figura 11) tanto las concentraciones de progesterona como el diámetro de la glándula lútea primaria eran similares a los promedios del grupo testigo en la semana 5, pero a partir del inicio de la administración de antarelix las concentraciones de progesterona se redujeron gradualmente durante las siguientes dos semanas hasta llegar a niveles basales en la semana 7, cuando se registró el aborto. Durante este tiempo también se produjo una reducción gradual en el diámetro de la glándula lútea primaria. Dado que en esta yegua nunca produjo eCG, es probable que la ausencia simultánea de eCG y LH (suprimida por el antarelix) haya sido la causa de la falla de la función lútea.



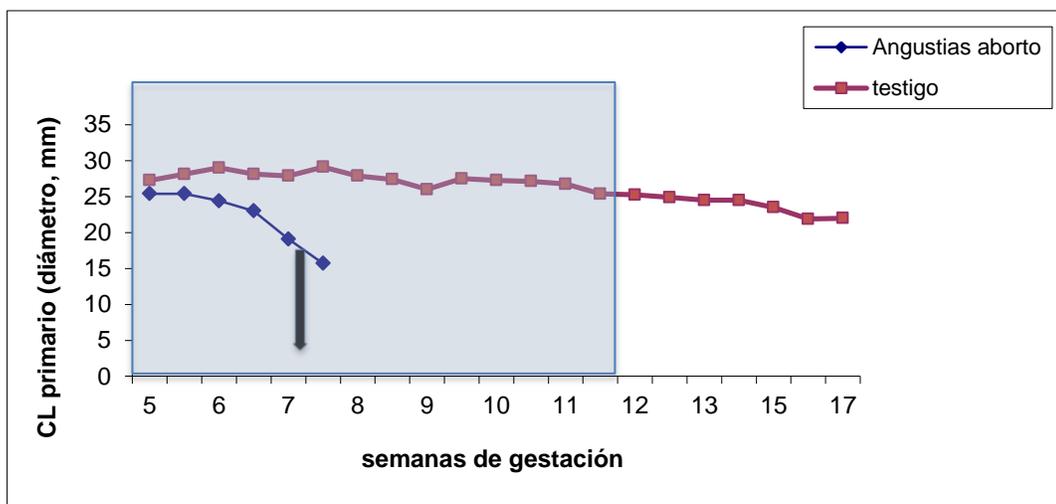
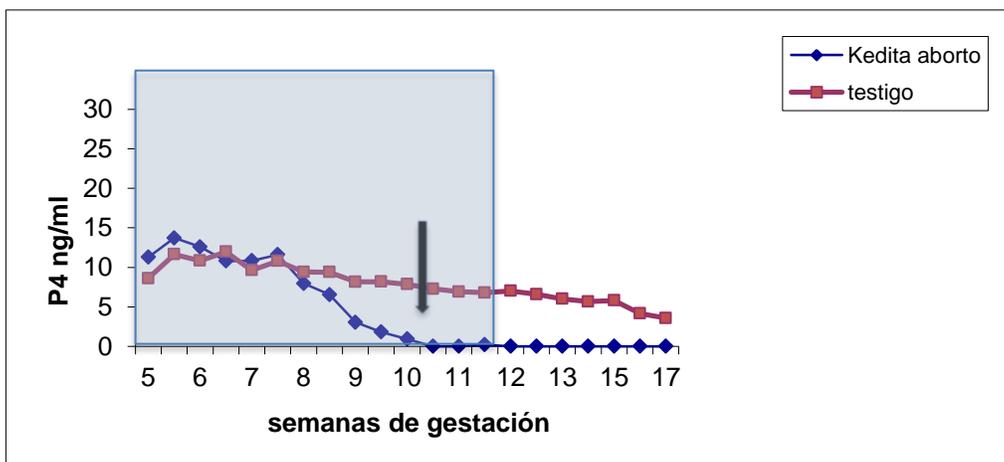


Figura 11. Concentraciones de progesterona, eCG y diámetro del cuerpo lúteo primario en una gestación mular que sufrió muerte fetal por deficiencia lútea secundaria. Las flechas indican el momento en que se registró la muerte fetal. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.

En la yegua “Kedita” (figura 12) tanto las concentraciones de progesterona como las de eCG eran similares a los promedios de las yeguas testigo hasta la semana 8. Sin embargo, a partir de la semana 8 las concentraciones de eCG y P4 y diámetro del cuerpo lúteo primario disminuyeron en forma rápida hasta llegar a niveles basales en la semana 10, que fue cuando se produjo el aborto.



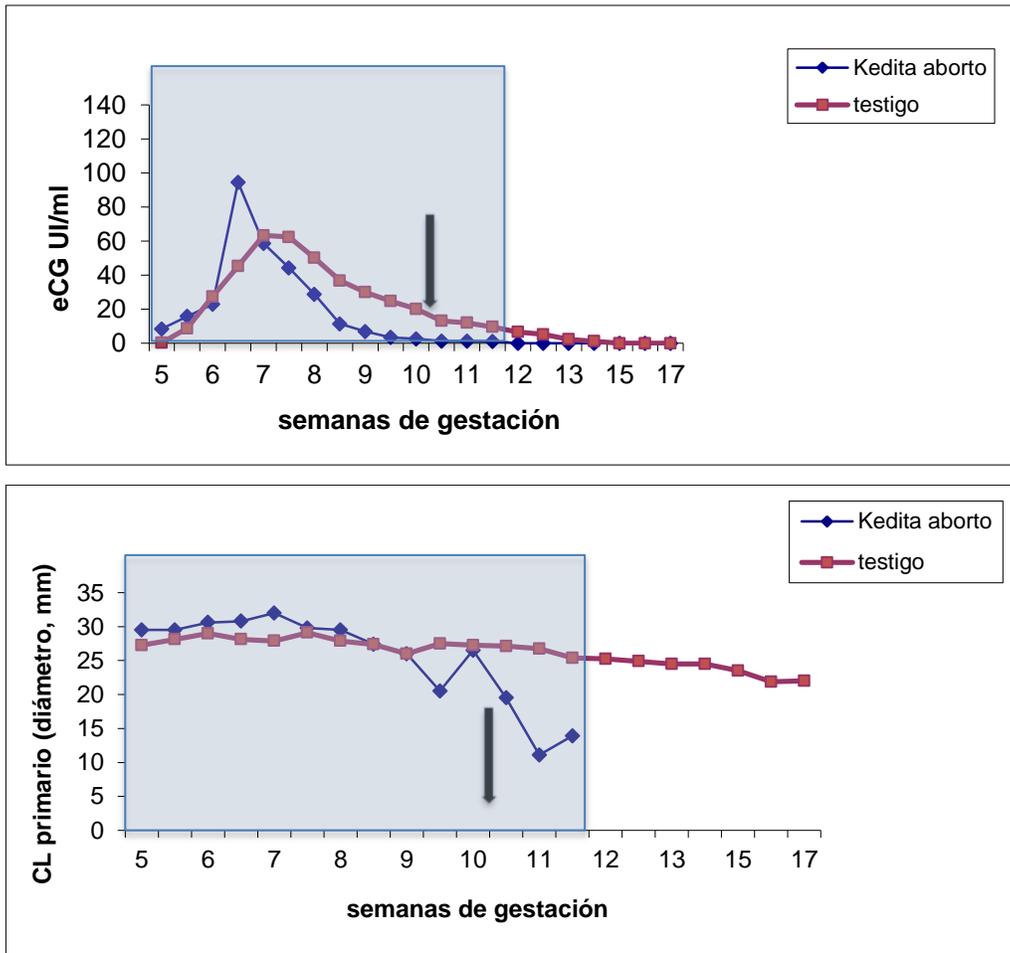


Figura 12. Concentraciones de progesterona, eCG y diámetro del cuerpo lúteo primario en una yegua con gestación mular tratada con antarelix que sufrió muerte fetal por insuficiencia lútea secundaria (falta de apoyo gonadotrópico) en la semana 10 de gestación. Las flechas indican el momento en que se registró la muerte fetal. La zona sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.

El caso de la yegua “Gris” (figura 13) es similar al de “Kedita”. Esta yegua inició con concentraciones normales de progesterona y eCG, pero la caída prematura en la secreción de eCG a partir de la semana 6 dejó sin soporte gonadotrópico al cuerpo lúteo, por lo que a lo largo de varias semanas se produjo una reducción gradual en su función hasta llegar a niveles basales en la semana 9, cuando ocurrió el aborto.. La causa más probable de la pérdida fetal es una deficiencia lútea secundaria por falta de apoyo gonadotrópico.

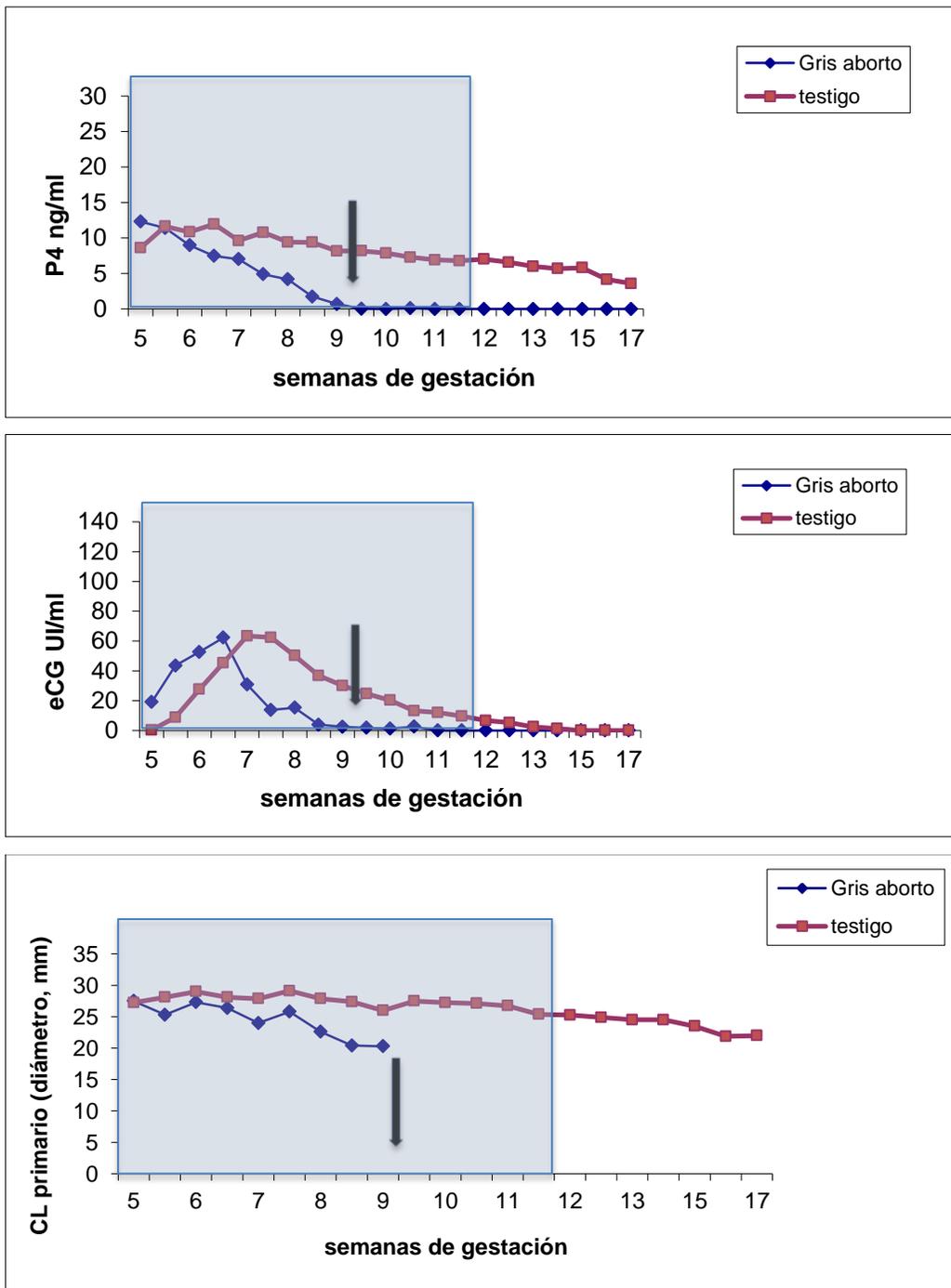
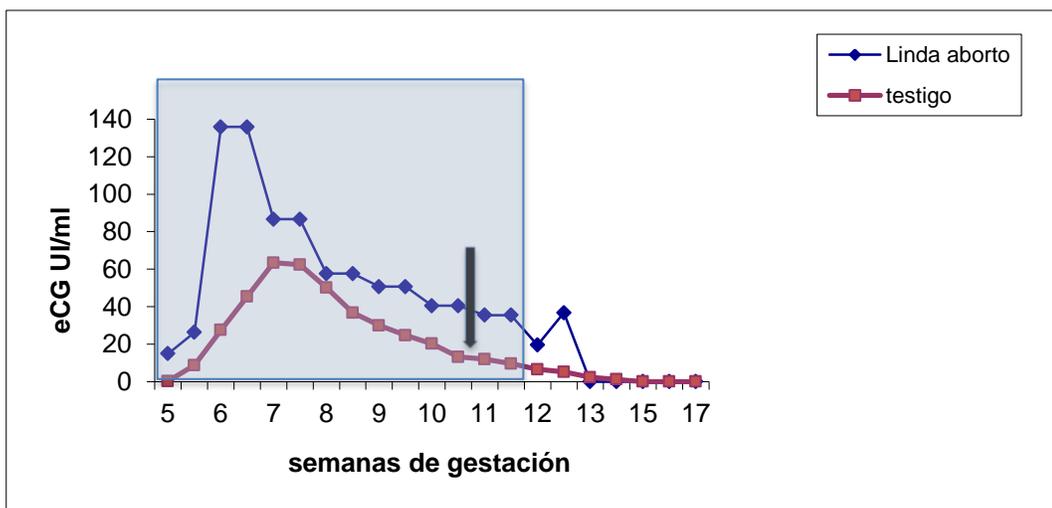
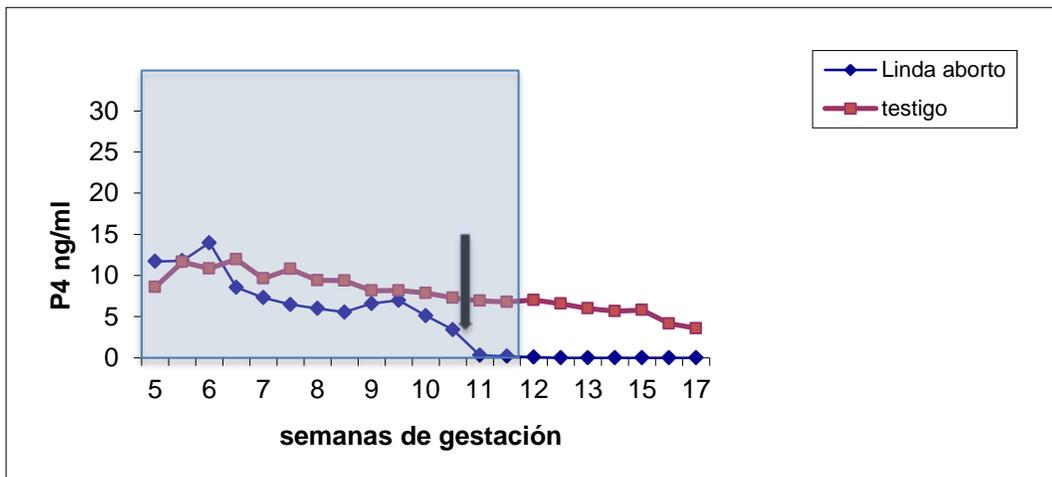


Figura 13. Concentraciones de progesterona, eCG y diámetro del cuerpo lúteo primario en una yegua con gestación mular tratada con antarelix que sufrió mortalidad fetal por deficiencia lútea secundaria. Las flechas indican el momento en que se registró la muerte fetal. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.

La yegua “Linda” (figura 14) es la única yegua que abortó que siempre tuvo concentraciones de eCG considerablemente superiores al promedio del grupo testigo, lo que resultó en concentraciones de progesterona cercanas al promedio de las yeguas testigo con gestación mular durante la mayor parte del tiempo a pesar de haberse suprimido la secreción de LH con el antarelix. Sin embargo, entre la semanas 10 y 11 se produjo una abrupta caída en las concentraciones de progesterona, llegando a niveles basales en tan solo dos muestreos, lo que sugiere un proceso de luteólisis activa que podría explicar la pérdida de función lútea a pesar de existir concentraciones de eCG superiores al promedio. En esta yegua el diámetro del cuerpo lúteo primario se mantuvo constante hasta el momento en que la progesterona llegó a niveles basales en la semana 11 de la gestación.



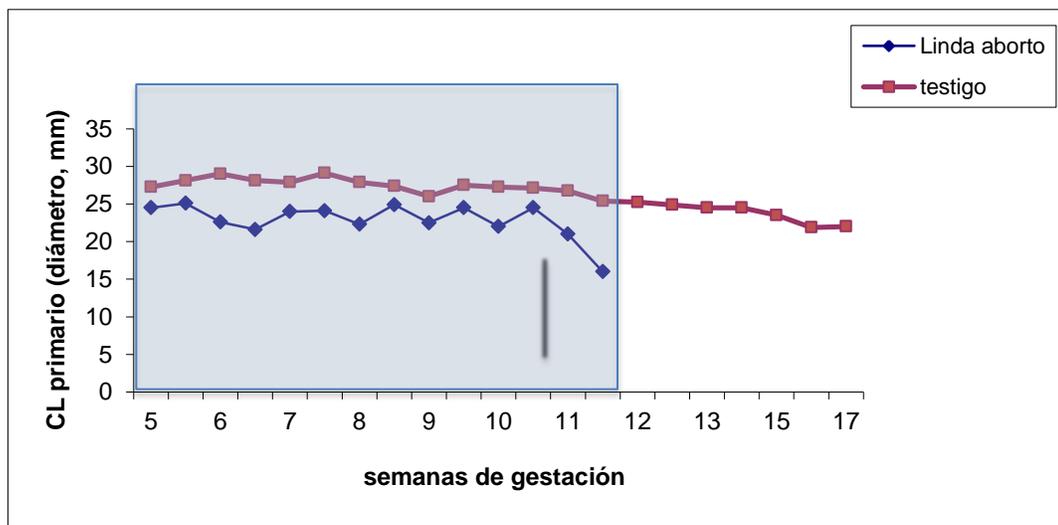


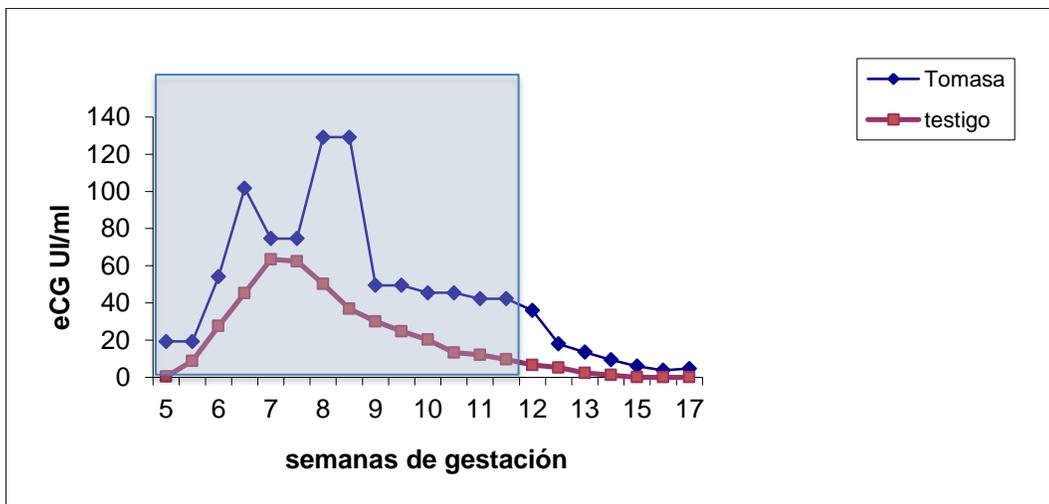
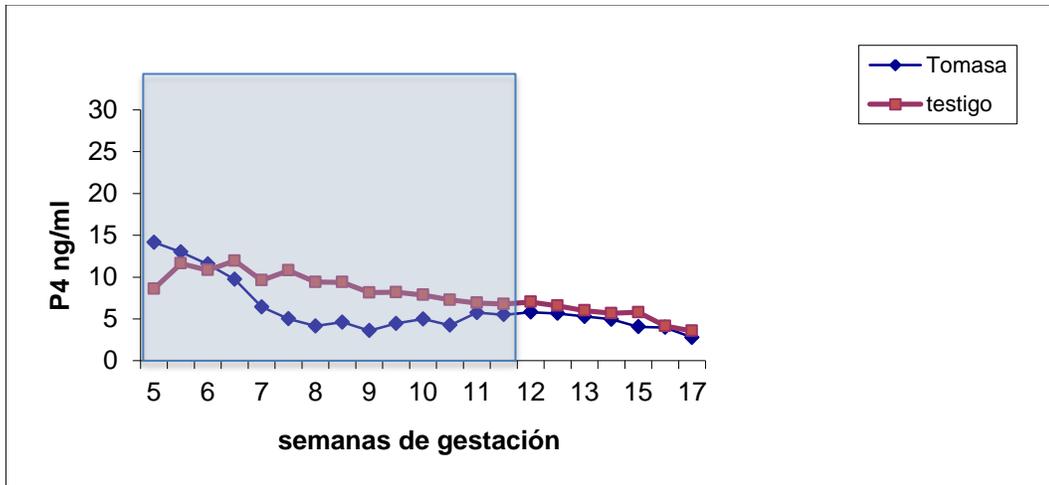
Figura 14. Concentraciones de progesterona, eCG y diámetro del cuerpo lúteo primario en una yegua con gestación mular tratada con antarelix que sufrió mortalidad fetal por deficiencia lútea debida a luteólisis activa. Las flechas indican el momento en que se registró la muerte fetal. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.

9.2 Descripción de los casos de yeguas con gestación mular tratadas con antarelix que no perdieron la gestación

En esta sección se presentan los casos de las tres yeguas con gestación mular que no perdieron la gestación a pesar de haber sido tratadas con antarelix. Con el objeto de identificar las posibles causas de su resistencia, en las gráficas se presentan los valores individuales de cada una de estas yeguas comparándolos contra los valores promedio de las yeguas del grupo testigo (gestación mular sin tratamiento con antarelix).

La yegua “Tomasas” (figura 15) no perdió la gestación a pesar de haber sido tratada con antarelix. Entre la semana 5 y la semana 8 las concentraciones de progesterona se redujeron gradualmente pero sin llegar nunca a menos de 4 ng/ml. Esta yegua desde el inicio tenía concentraciones de eCG superiores al promedio para gestaciones mulares, y se mantuvo por arriba de los valores basales durante varias semanas después de que la hormona desapareció de la circulación en las yeguas testigo. Cabe destacar que entre la semana 8 y la semana 11 las concentraciones de progesterona se elevaron para igualarse a la de las yeguas testigo, lo

que coincidió precisamente con el periodo en que la producción de eCG de esta yegua era muy superior a la de las yeguas testigo. Esta fue la única yegua tratada con antarelix que formó un cuerpo lúteo secundario, suceso que ocurrió antes de iniciar el tratamiento con antarelix, posiblemente como resultado de la elevación prematura de las concentraciones de eCG.



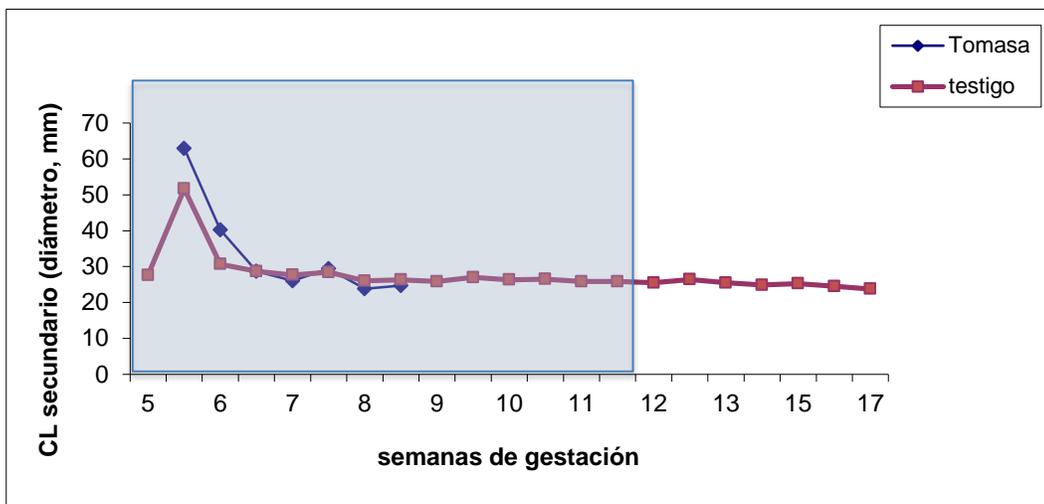
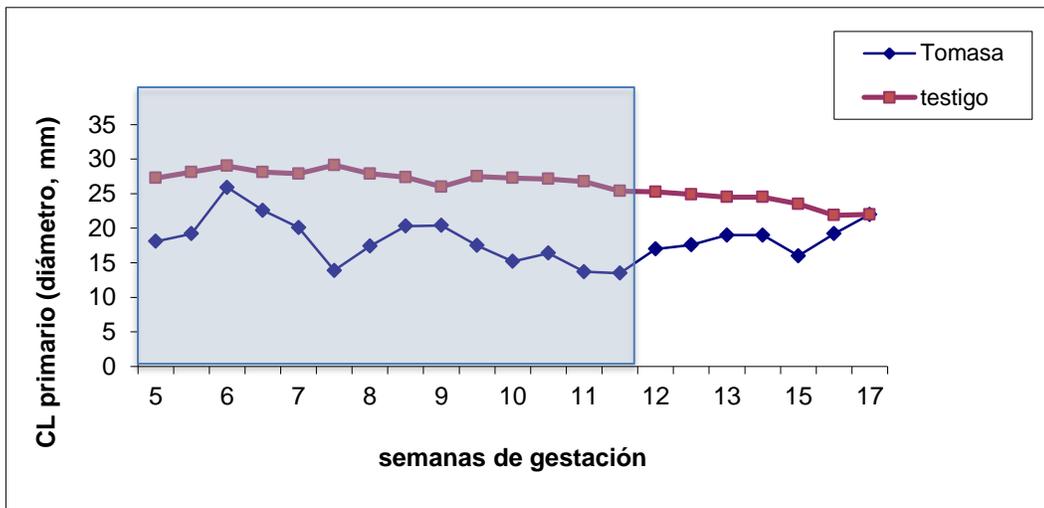


Figura 15. Concentraciones de progesterona, eCG, diámetro del cuerpo lúteo primario y secundario en una yegua con gestación mular que mantuvo la gestación a pesar de haber sido tratada con antarelix. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.

La yegua “Centella” (figura 16) continuó con su gestación sin presentar abortó a pesar de haber sido tratada con antarelix. Esto puede deberse a que en todo momento produjo concentraciones de eCG muy por encima del promedio para yeguas testigo con gestación mular, por lo que también produjo más progesterona de lo normal a pesar de tener posiblemente suprimida la secreción de LH.

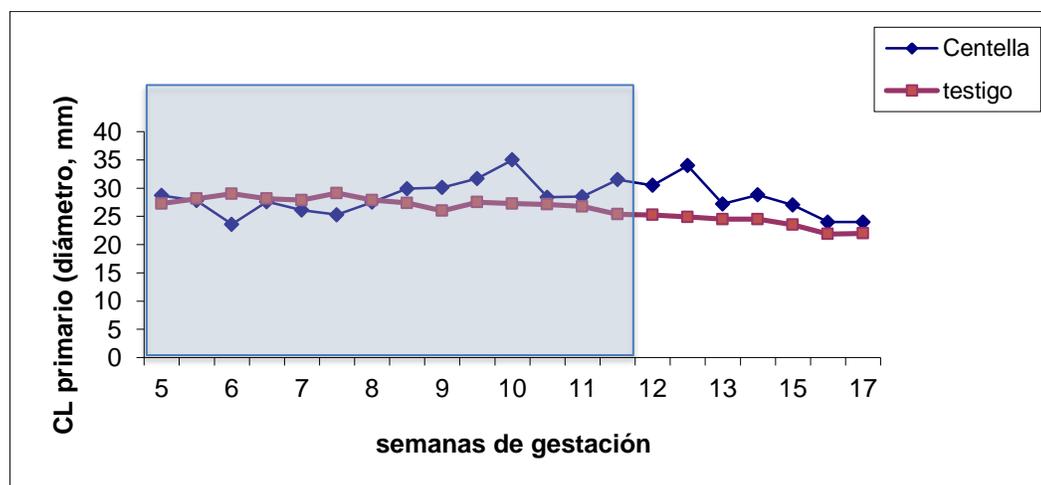
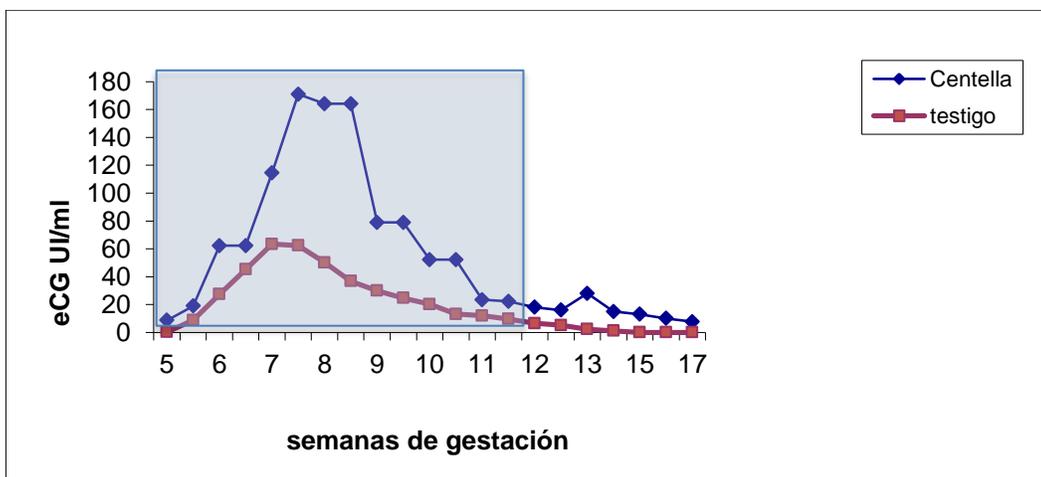
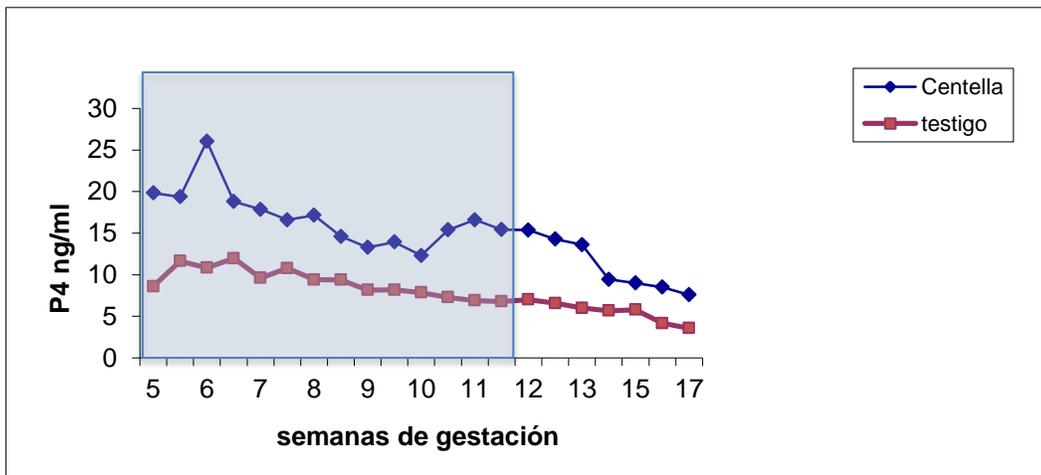
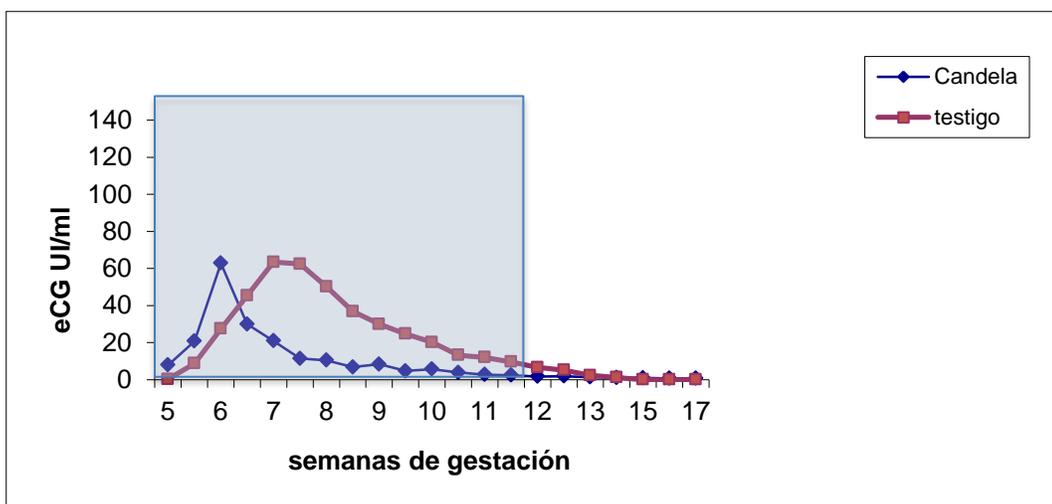
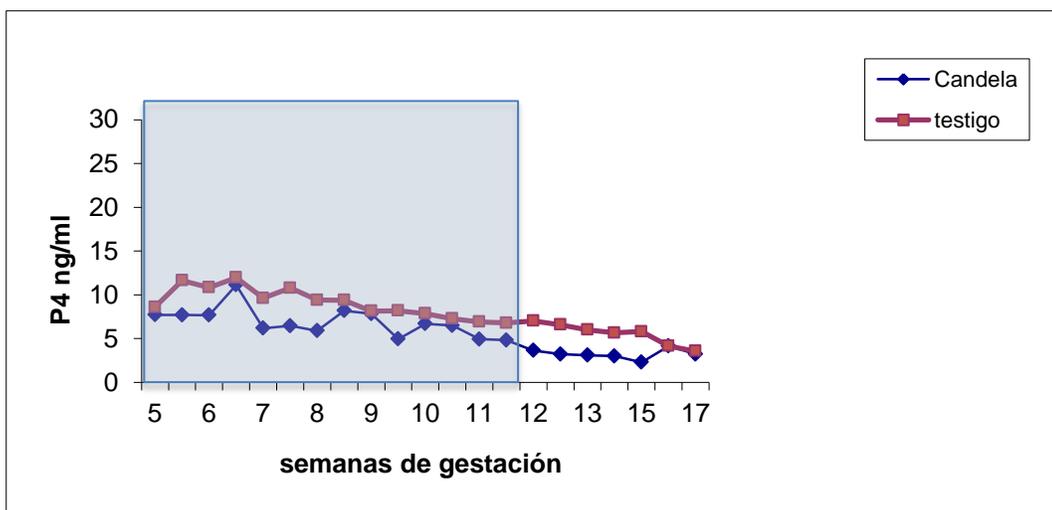


Figura 16. Concentraciones de progesterona, eCG y diámetro de cuerpo lúteo primario en una yegua con gestación mular que mantuvo la gestación a pesar de haber sido tratada con antarelix. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.

La yegua “Candela” (figura 17) tuvo una gestación exitosa a pesar de haber tenido una caída prematura en las concentraciones de eCG con respecto al grupo testigo. Tanto las concentraciones de progesterona como el diámetro del cuerpo lúteo primario al parecer indican que no se resintió una falta de apoyo gonadotrópico. Debe mencionarse que, aunque tuvo una caída prematura en las concentraciones de eCG, el ritmo de la caída fue menor que el que se presentó en las yeguas que si abortaron, por lo que en la semana 10 aún tenía concentraciones detectables.



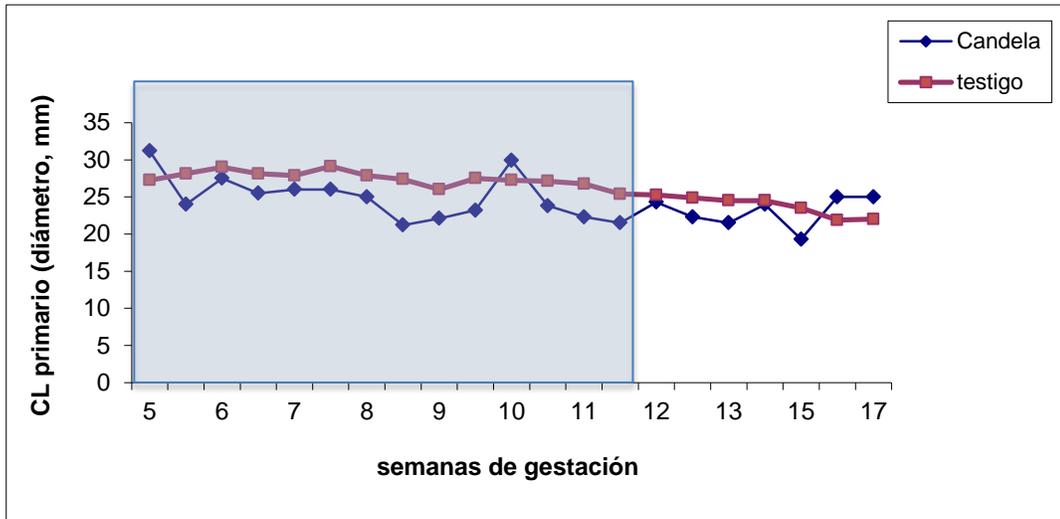
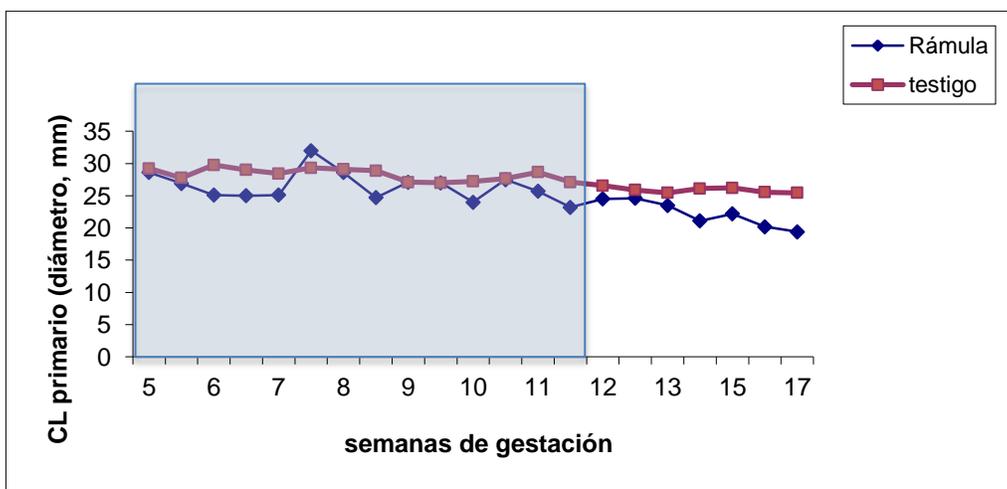
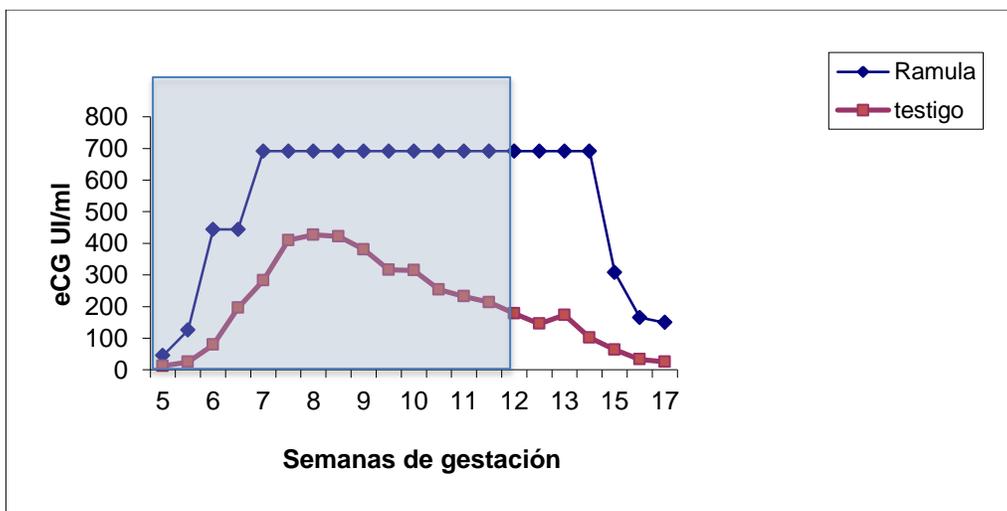
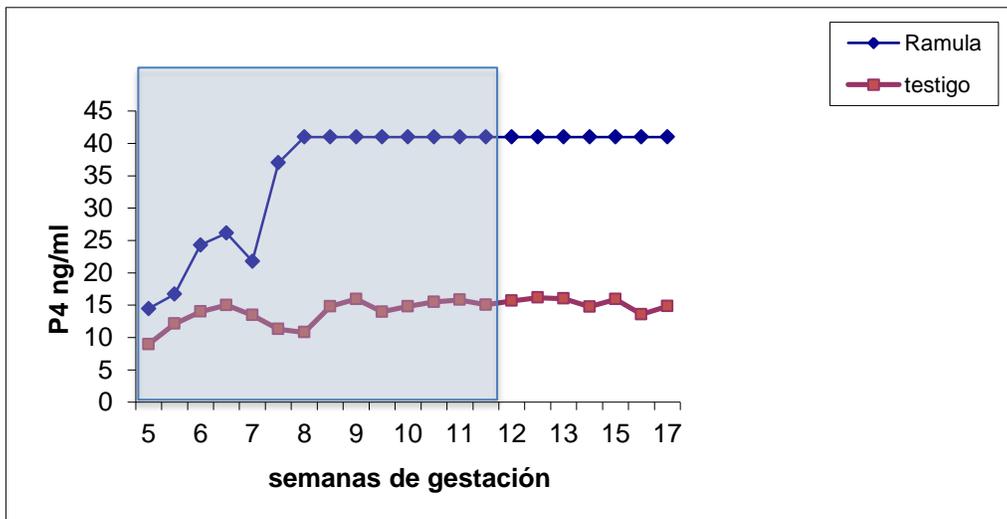


Figura 17. Concentraciones de progesterona, eCG y diámetro de cuerpo lúteo primario en una gestación mular que mantuvo la gestación. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.

9.3 Descripción de los casos de yeguas con gestaciones equinas tratadas con antarelix

En las siguientes gráficas se comparan individualmente los resultados de yeguas con gestación equina tratadas con antarelix contra los valores promedio de su grupo testigo (grupo de yeguas con gestación equina que no recibieron tratamiento con antarelix). El hallazgo más relevante es la generación de un gran número de FHAs en algunas yeguas.

La yegua “Rámula” (figura 18) tuvo concentraciones muy elevadas tanto de progesterona como de eCG desde la semana 8 de la gestación. A pesar de ello, ni el diámetro del cuerpo lúteo primario ni el del cuerpo lúteo secundario fueron mayores al promedio para el grupo testigo. Sin embargo, a partir de la semana 7 comenzaron a aparecer FHAs que terminaron convirtiéndose en cuerpos lúteos accesorios, acumulando un total 9 cuerpos lúteos accesorios, que en conjunto llegaron a tener un volumen de casi 400 ml. La aparición de estas estructuras coincidió con una brusca elevación de las concentraciones de progesterona.



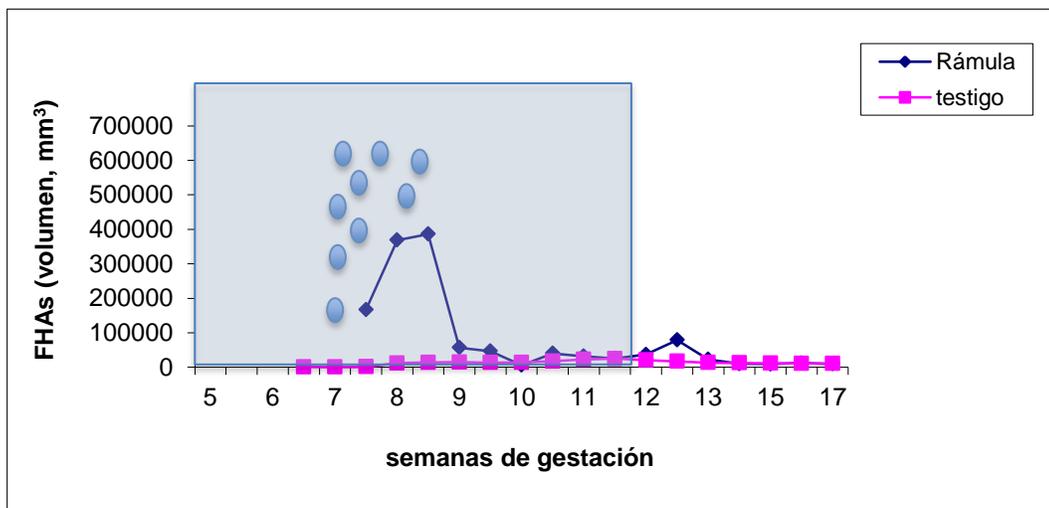
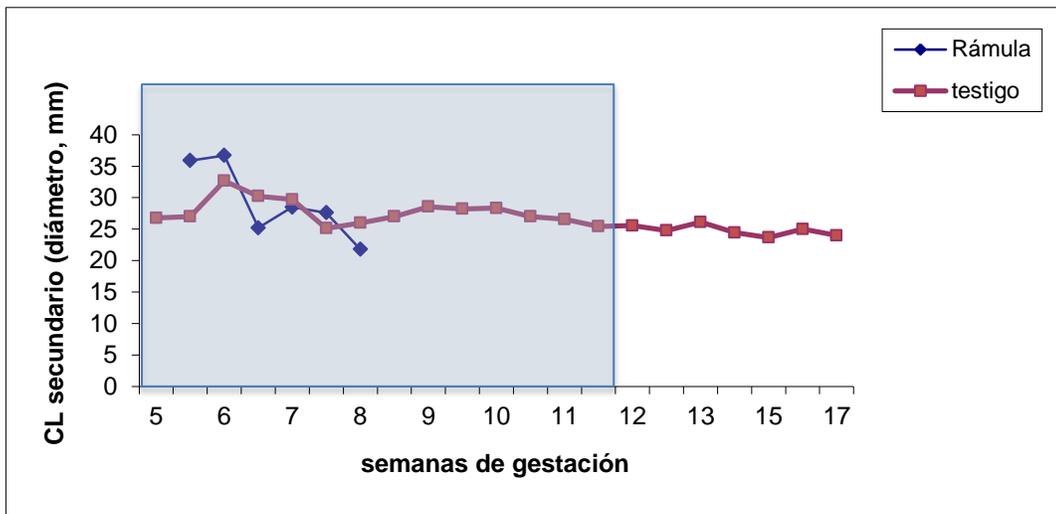
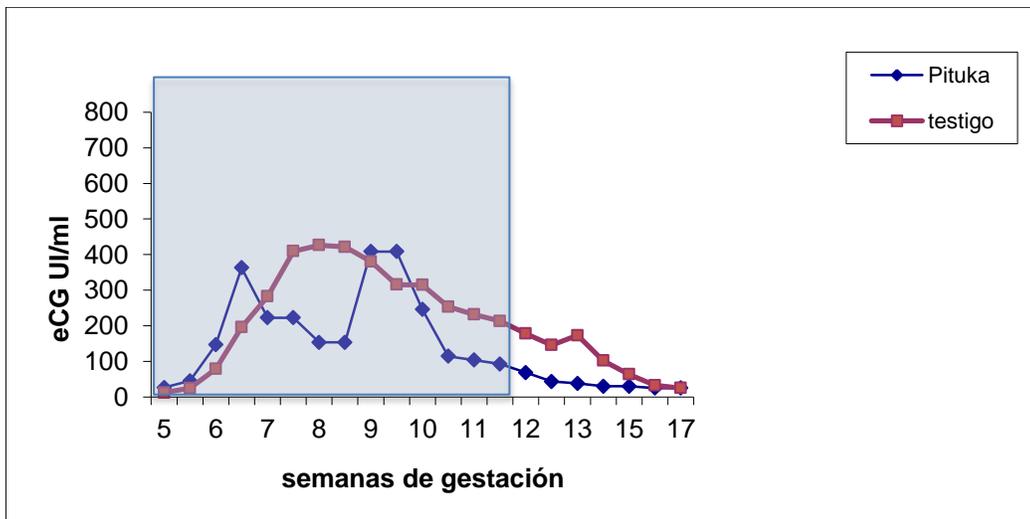
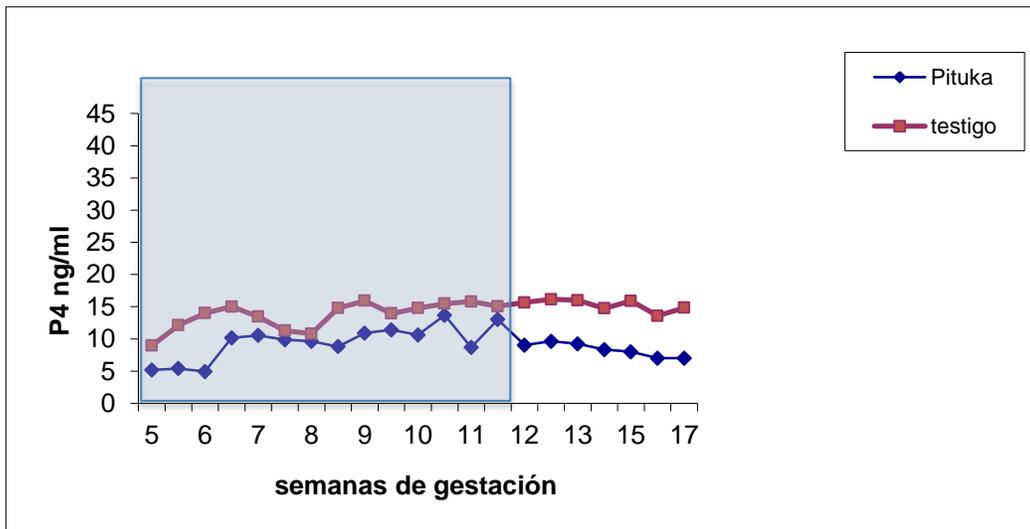


Figura 18. Concentraciones de progesterona y eCG, diámetro del cuerpo lúteo primario, cuerpo lúteo secundario y volumen de FHAs en una yegua con gestación equina tratada con antarelix. Los óvalos indican el momento en el que se detectó por primera vez cada FHAs. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.

En la yegua “Pituka” (figura 19) las concentraciones de progesterona y eCG, así como el diámetro del cuerpo lúteo primario estuvieron ligeramente por debajo del promedio del grupo yeguas testigo con gestación equina. A partir de la semana 7 esta hembra presentó seis FHAs que terminaron transformándose en cuerpos lúteos accesorios. Sin embargo, el volumen total acumulado de los FHAs fue varias veces menor al de la yegua anterior, y la formación de los cuerpos lúteos accesorios no se vio reflejado en concentraciones de

progesterona mas elevadas que las del grupo testigo. Las concentraciones de eCG durante las semanas 7 y 8 de la gestación (cuando se formaron los FHAs) fueron considerablemente menores al promedio, lo que puede haber sido la causa del pobre desarrollo de los FHAs, así como de su baja producción de progesterona.



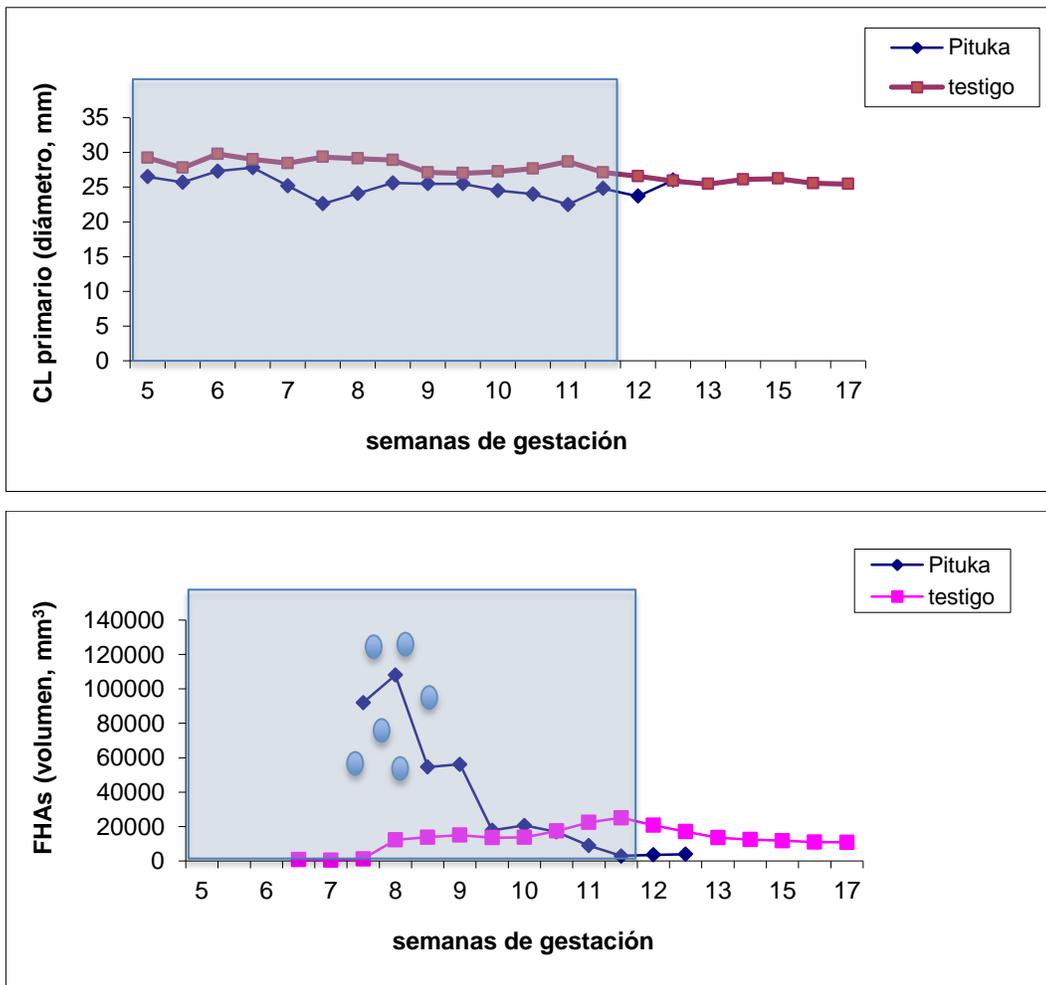
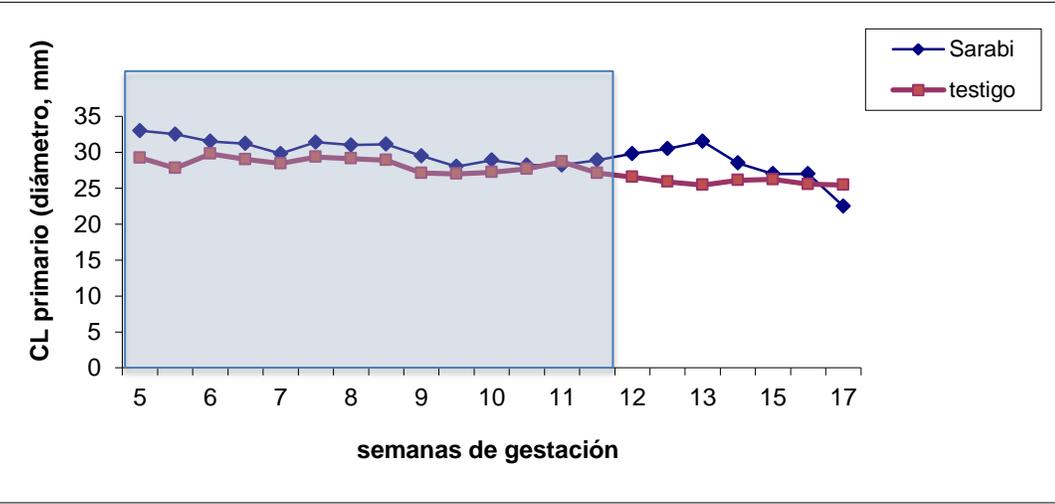
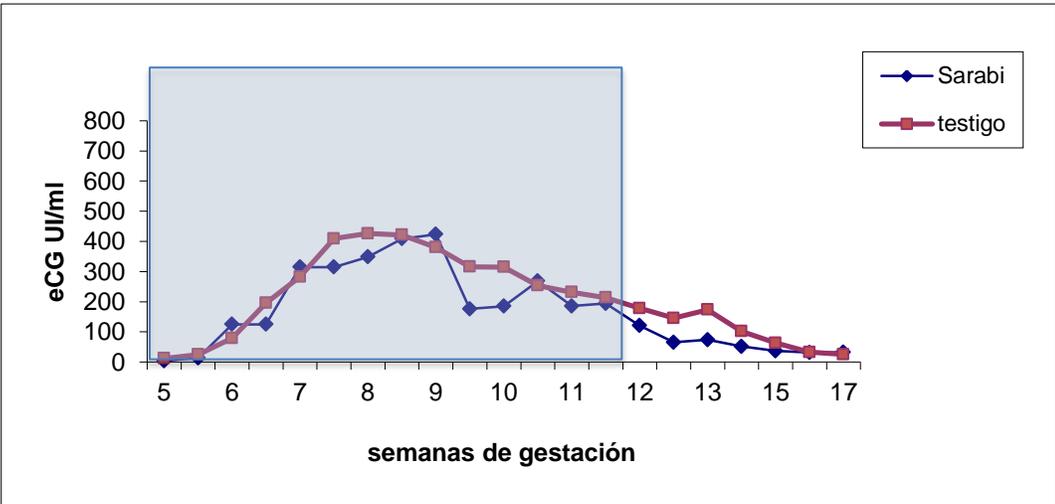
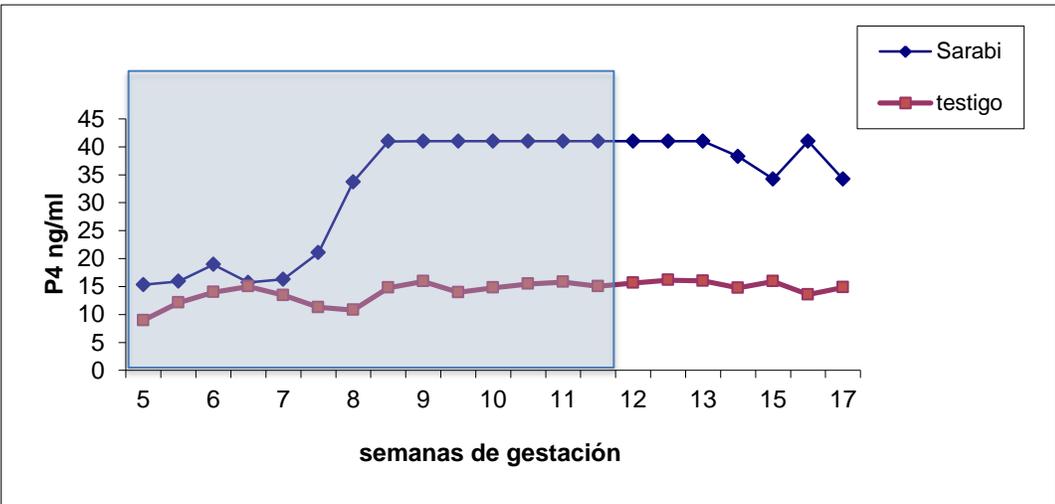


Figura 19. Concentraciones de progesterona, eCG, diámetro de cuerpo lúteo primario y volumen de glándulas lúteas accesorias en una yegua con gestación equina tratada con antarelix. Los óvalos indican el momento en el que se detectó por primera vez cada cuerpo lúteo accesorio. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.

En la yegua “Sarabi” (figura 20) las concentraciones de eCG fueron similares a los de las yeguas testigo con gestación equina. Sin embargo, entre la semana 7 y 8.5 se formaron una gran cantidad de FHAs (13 en total), con un volumen total acumulado de más de 600 ml. La formación de estos FHAs fue rápidamente seguida por un gran incremento en las concentraciones de progesterona a pesar de que las concentraciones de eCG eran similares a las del promedio de las yeguas testigo.



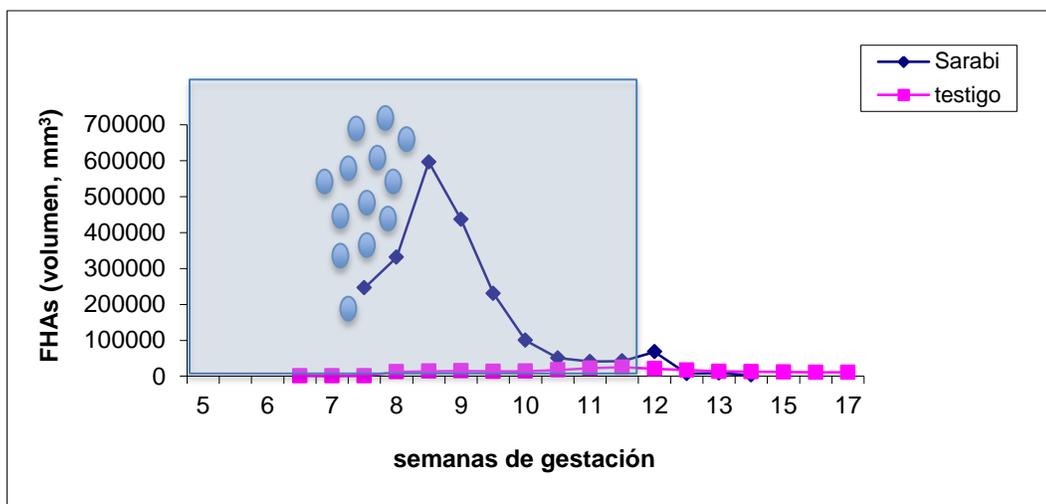


Figura 20. Concentraciones de progesterona y eCG, diámetro de cuerpo lúteo primario y volumen de FHAs en una yegua con gestación equina tratada con antarelix. Los óvalos indican el momento en el que se detectó por primera vez cada cuerpo lúteo accesorio. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.

En la yegua “Nieves” (figura 21) las concentraciones de progesterona estuvieron por debajo de los niveles del grupo control y solo presentó una elevación importante de eCG (639 UI/ml) entre la semana 8 y 9 de la gestación para después caer por debajo de los niveles del grupo control, lo que provocó que el cuerpo lúteo primario tuviera un pobre desarrollo, sin embargo, como se muestra en las gráficas se nota el efecto luteotrópico sobre el cuerpo lúteo primario al momento en que la eCG se eleva. Esta es una de las dos yeguas de este grupo (2/9) que no presentó cuerpos lúteos suplementarios.

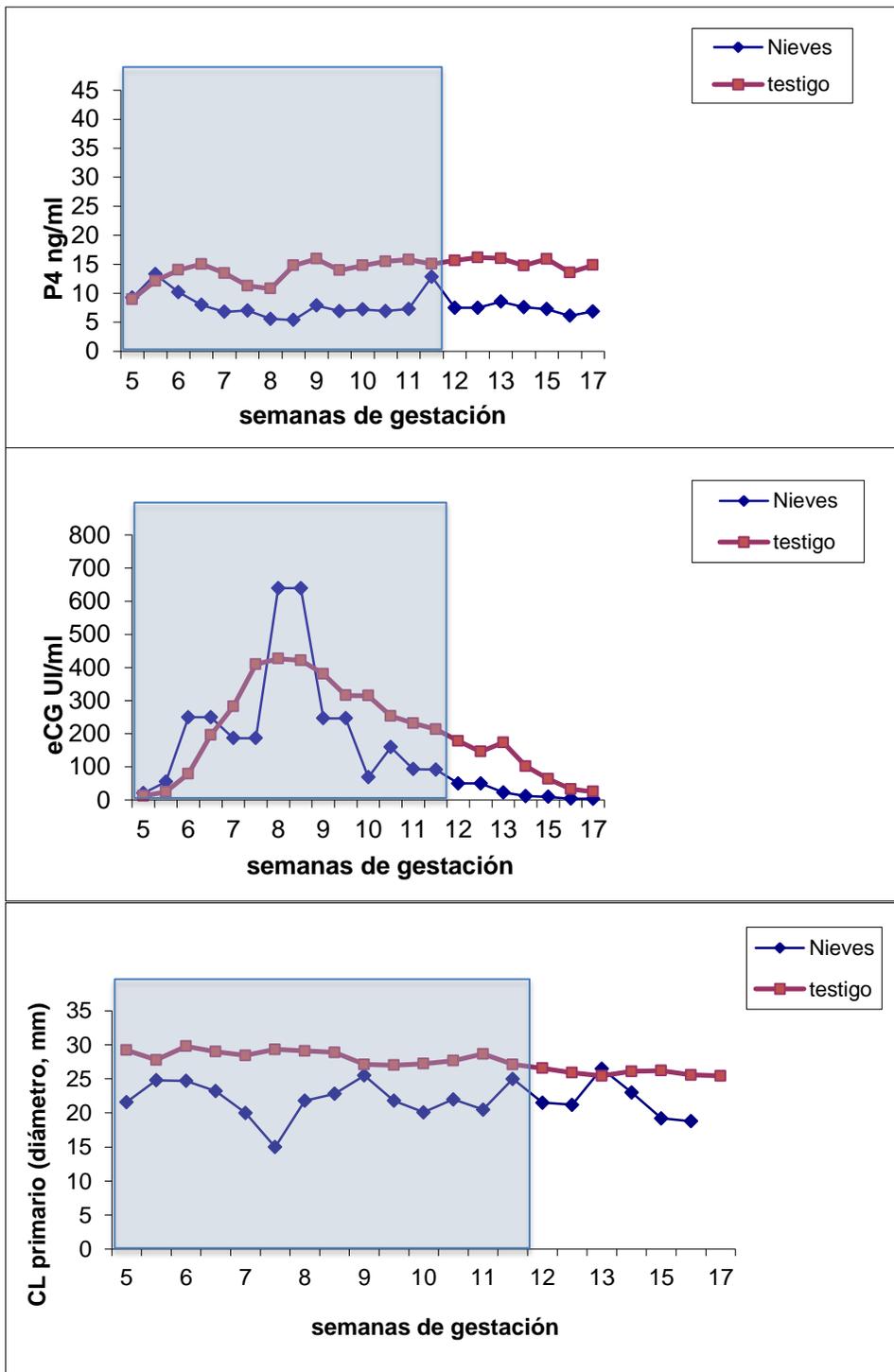
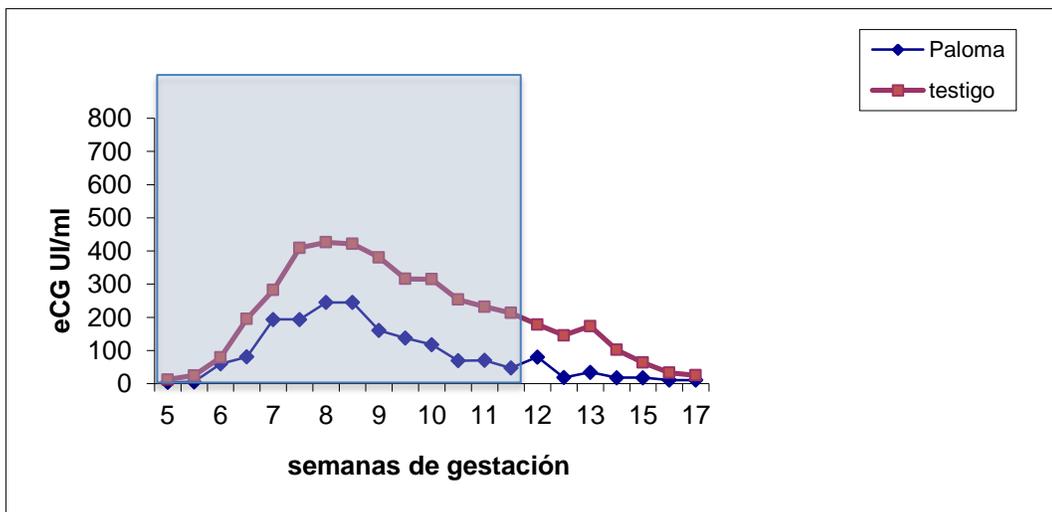
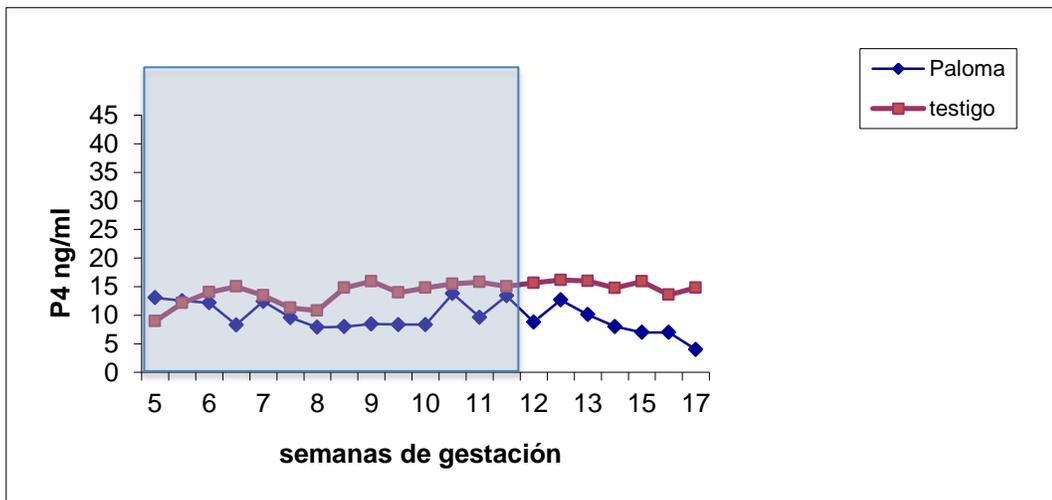


Figura 21. Concentraciones de progesterona, eCG y diámetro de cuerpo lúteo primario en una gestación equina tratada con antarelix. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.

En la yegua “Paloma” (figura 22) las concentraciones de progesterona estuvieron siempre por debajo del promedio del grupo control, sin embargo su secreción fue constante y estable. La eCG también presentó niveles inferiores que los del grupo control llegando apenas a un máximo de 244 UI/ml en la semana 8 de la gestación para después descender paulatinamente. El cuerpo lúteo primario presentó un buen diámetro durante todo el estudio de entre 25 y 31 mm. Esta es otra de las dos yeguas del grupo de gestaciones equinas (2/9) que no presentaron cuerpos lúteos suplementarios.



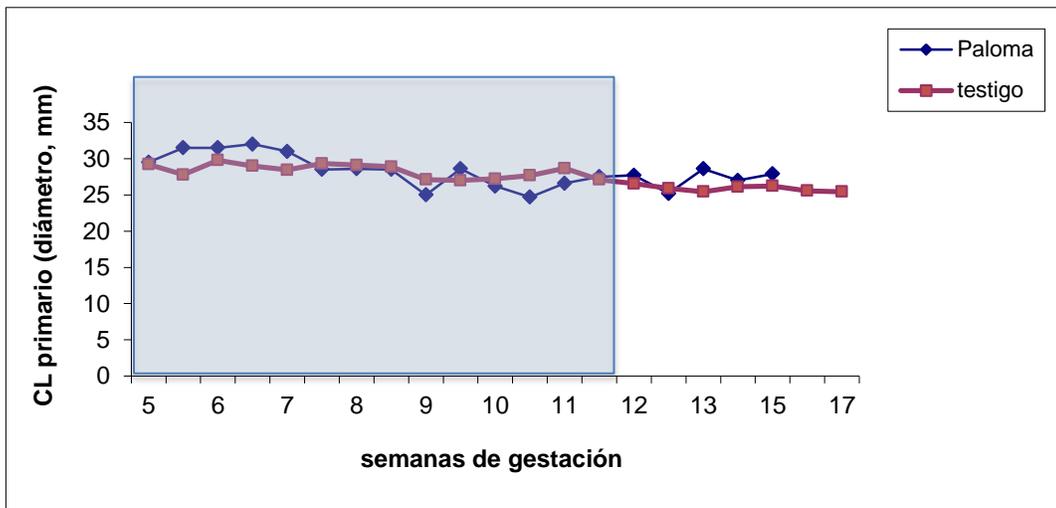
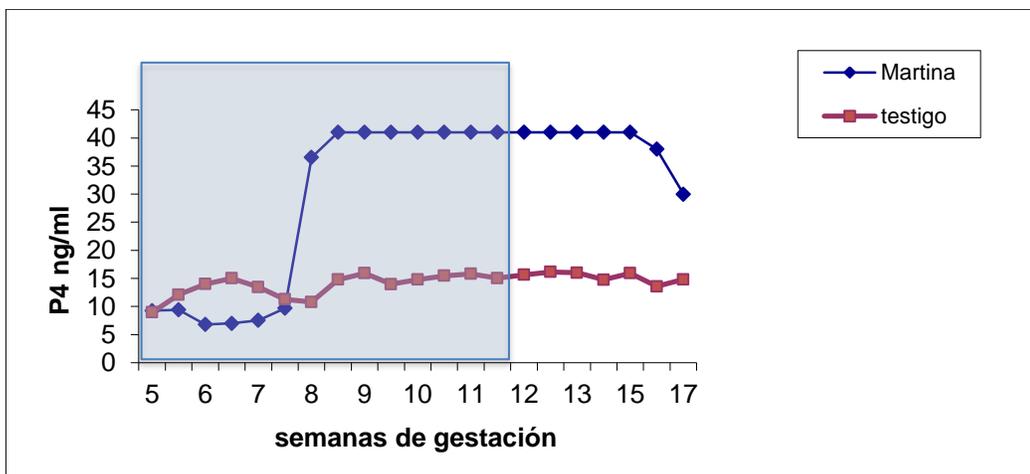
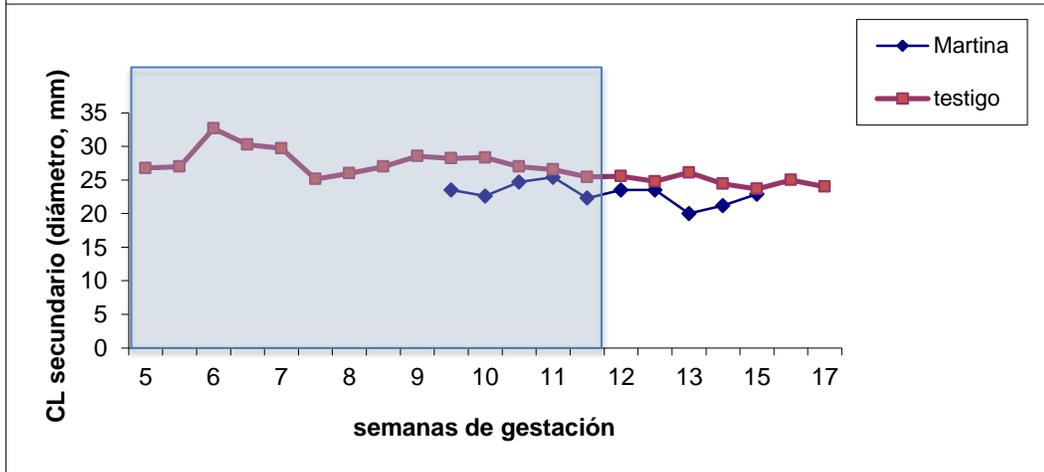
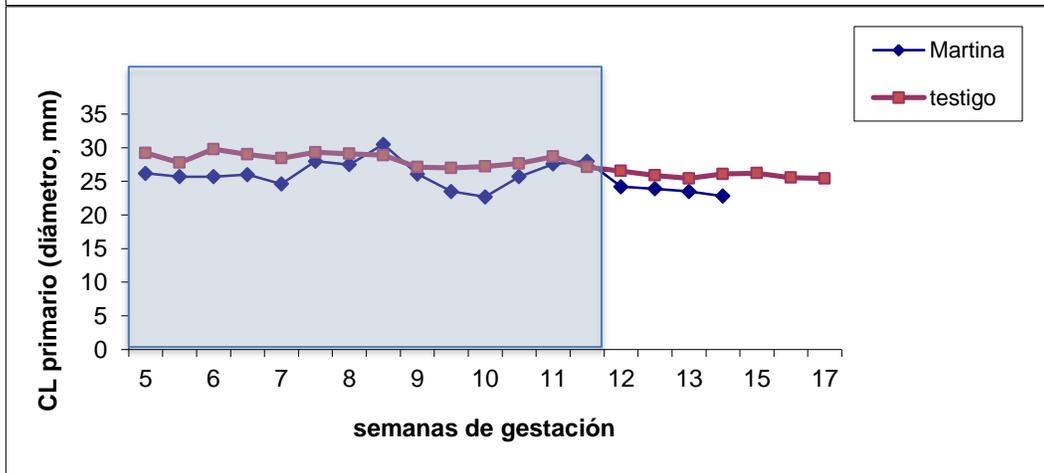
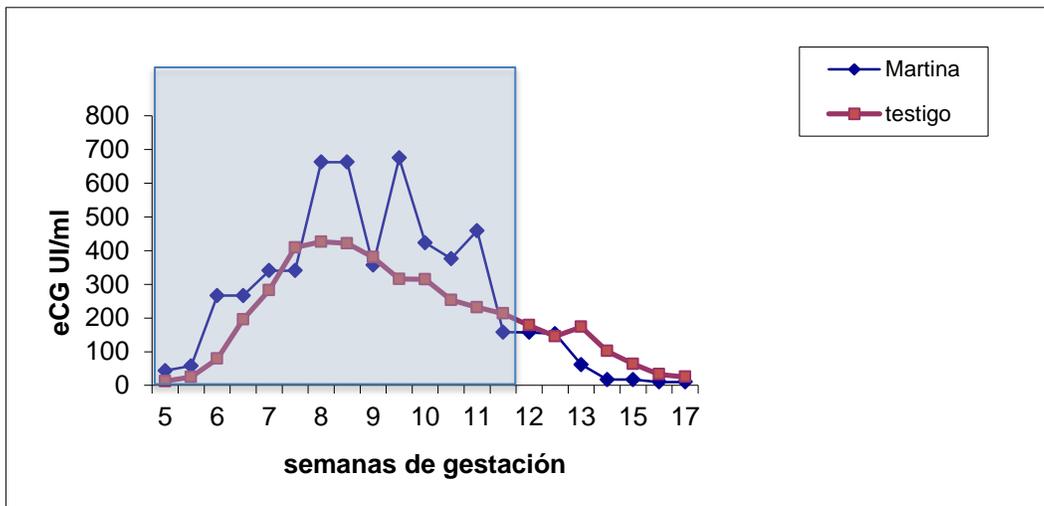


Figura 22. Concentraciones de progesterona, eCG y diámetro de cuerpo lúteo primario en una gestación equina tratada con antarelix. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.

La yegua “Martina” (figura 23) mostró altas concentraciones de progesterona (41ng/ml) a partir de la semana 8 de la gestación coincidiendo con la elevación en los niveles de eCG (675 UI/ml). El cuerpo lúteo primario mostró tener un diámetro normal comparado con el grupo control. Esta fue una de las dos yeguas (2/9) de este grupo que presentó un cuerpo lúteo secundario a partir de la semana 9 de la gestación. El volumen de cuerpos lúteos accesorios que presentó desde la semana 7 por la formación de tres FHAs influyó aparentemente en las altas concentraciones de progesterona.





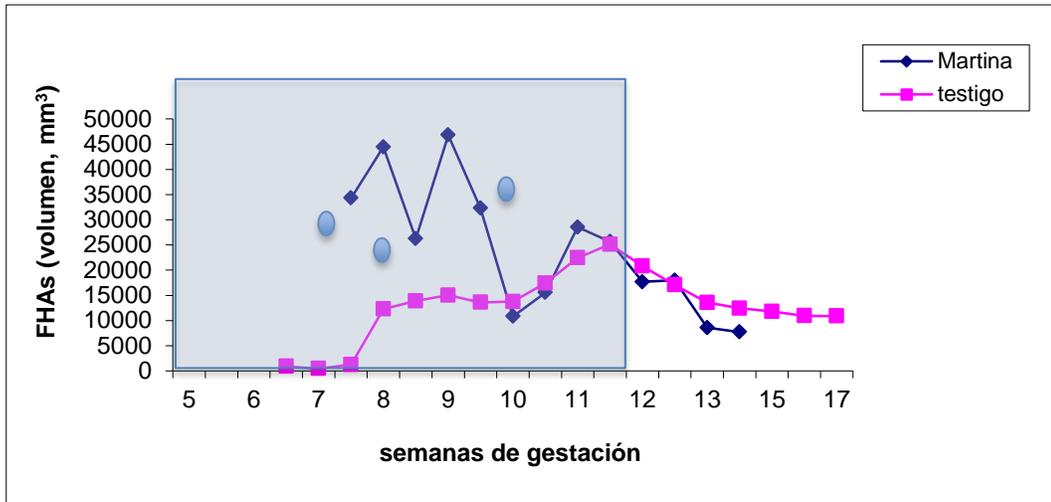
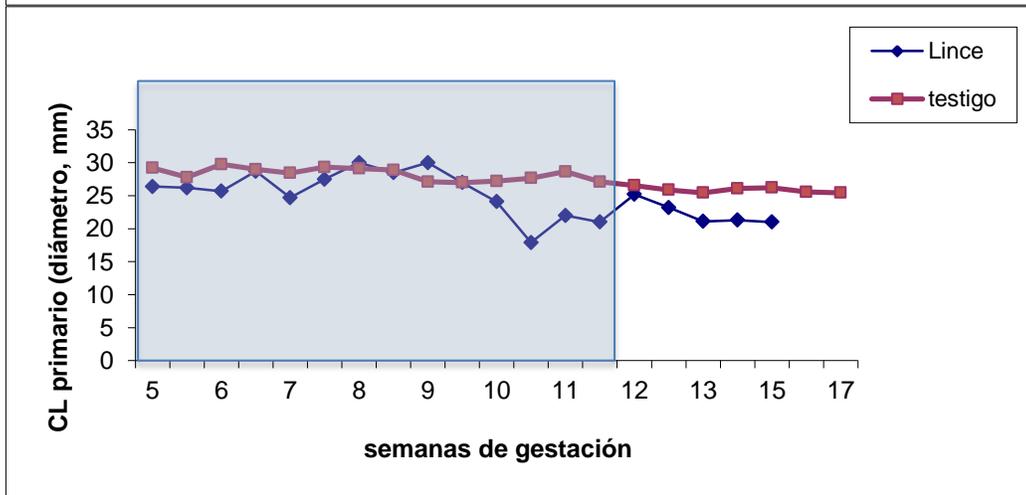
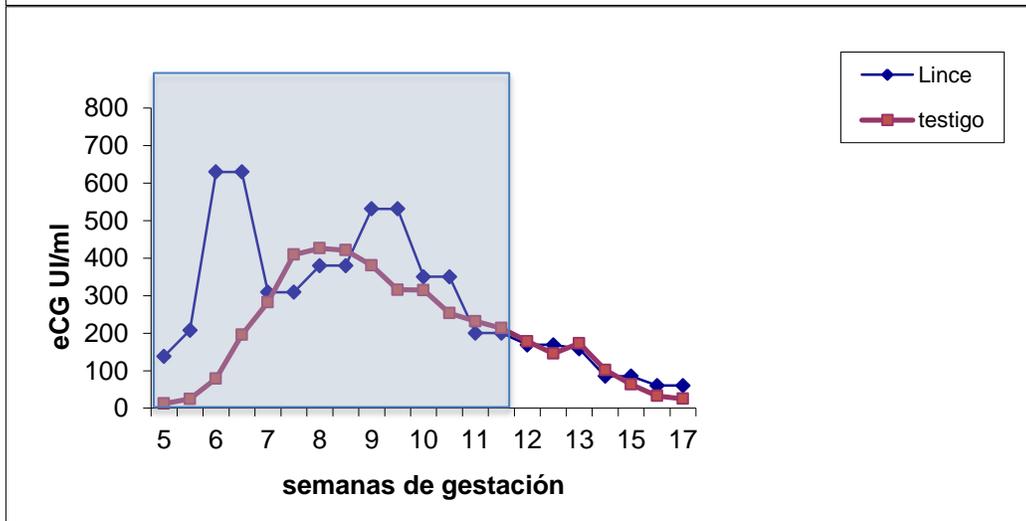
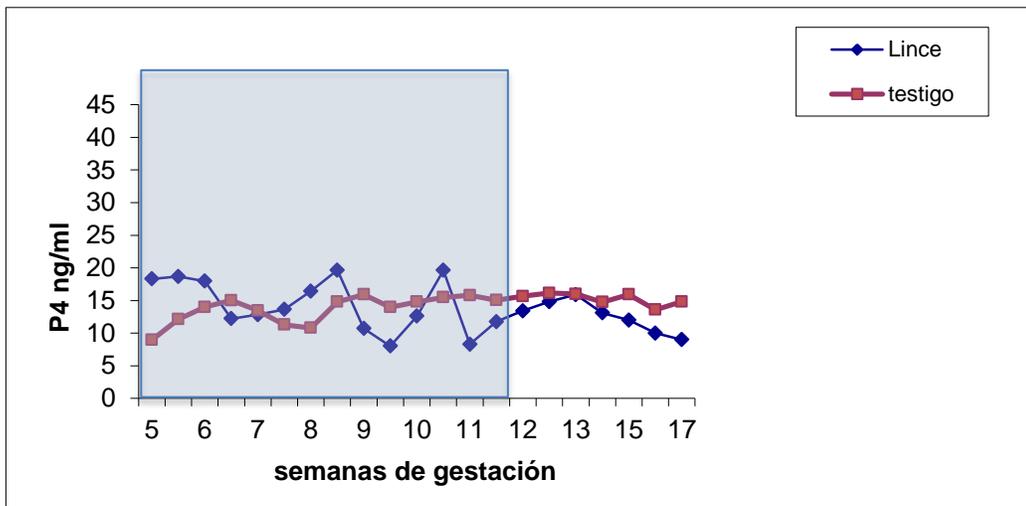


Figura 23. Concentraciones de progesterona, eCG, diámetro de cuerpo lúteo primario, cuerpo lúteo secundario y volumen de FHAs en una gestación equina tratada con antarelix. Los óvalos indican el momento en el que se detectó por primera vez cada cuerpo lúteo accesorio. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.

En la yegua “Lince” (figura 24) durante la semana 6 de la gestación las concentraciones de progesterona se mantuvieron dentro del promedio del grupo control y las cantidades de eCG fueron elevadas (630 UI/ml) para tener una caída vertiginosa en la semana 7 recuperando nuevamente sus niveles. El diámetro del cuerpo lúteo primario se mantuvo dentro del promedio del grupo control. Esta yegua solo presentó un cuerpo lúteo accesorio en la semana 8 y por ende su volumen fue mas bajo comparado con el grupo control. Aparentemente fue por esto que sus concentraciones de progesterona no fueron tan elevadas comparada con las yeguas que presentan mayor volumen de FHAs.



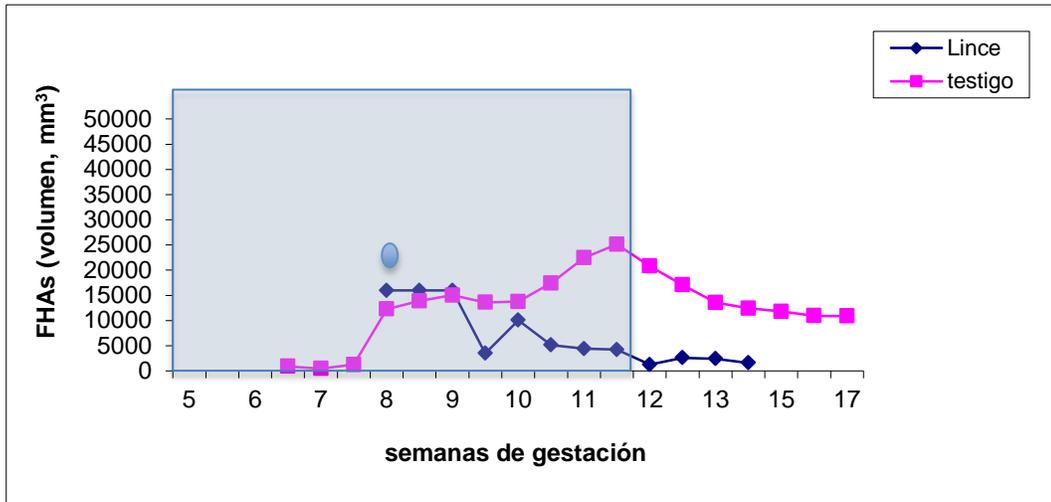
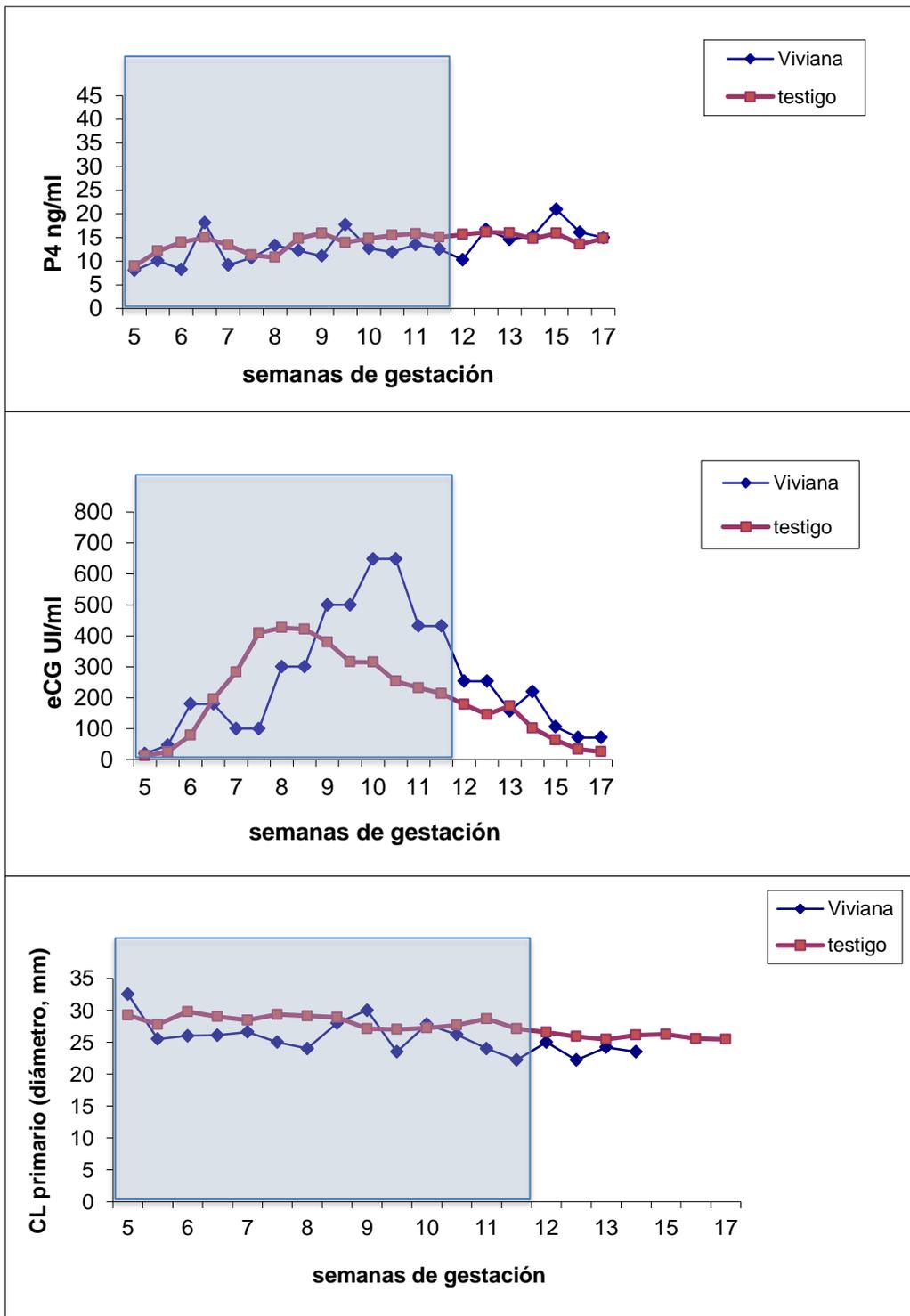


Figura 24. Concentraciones de progesterona, eCG, diámetro de cuerpo lúteo primario y volumen de FHAs en una gestación equina tratada con antarelix. Los óvalos indican el momento en que se detectó por primera vez cada cuerpo lúteo accesorio. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.

La yegua “Viviana” (figura 25) presentó cantidades de progesterona dentro del rango normal para una gestación equina, las concentraciones de eCG se elevaron paulatinamente hasta alcanzar su máximo (648 UI/ml) en la semana 10. El cuerpo lúteo primario tuvo un diámetro parecido a la del grupo control. A partir de la semana 6 se formaron 3 FHAs alcanzando su mayor volumen en la semana 9 de la gestación muy por arriba del volumen promedio del grupo control. Probablemente la elevación tardía de la eCG fue la responsable de tener una menor concentración de progesterona comparada con yeguas del grupo control.



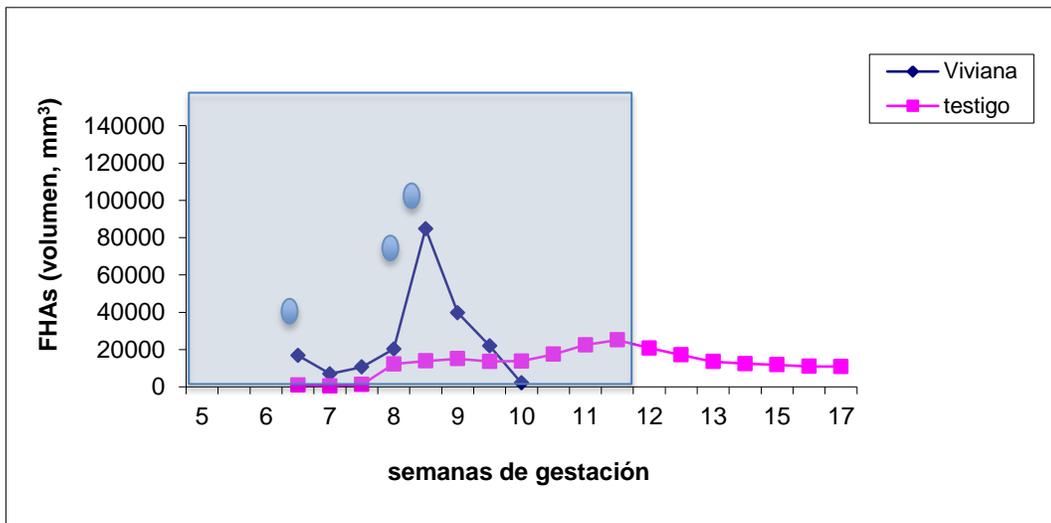
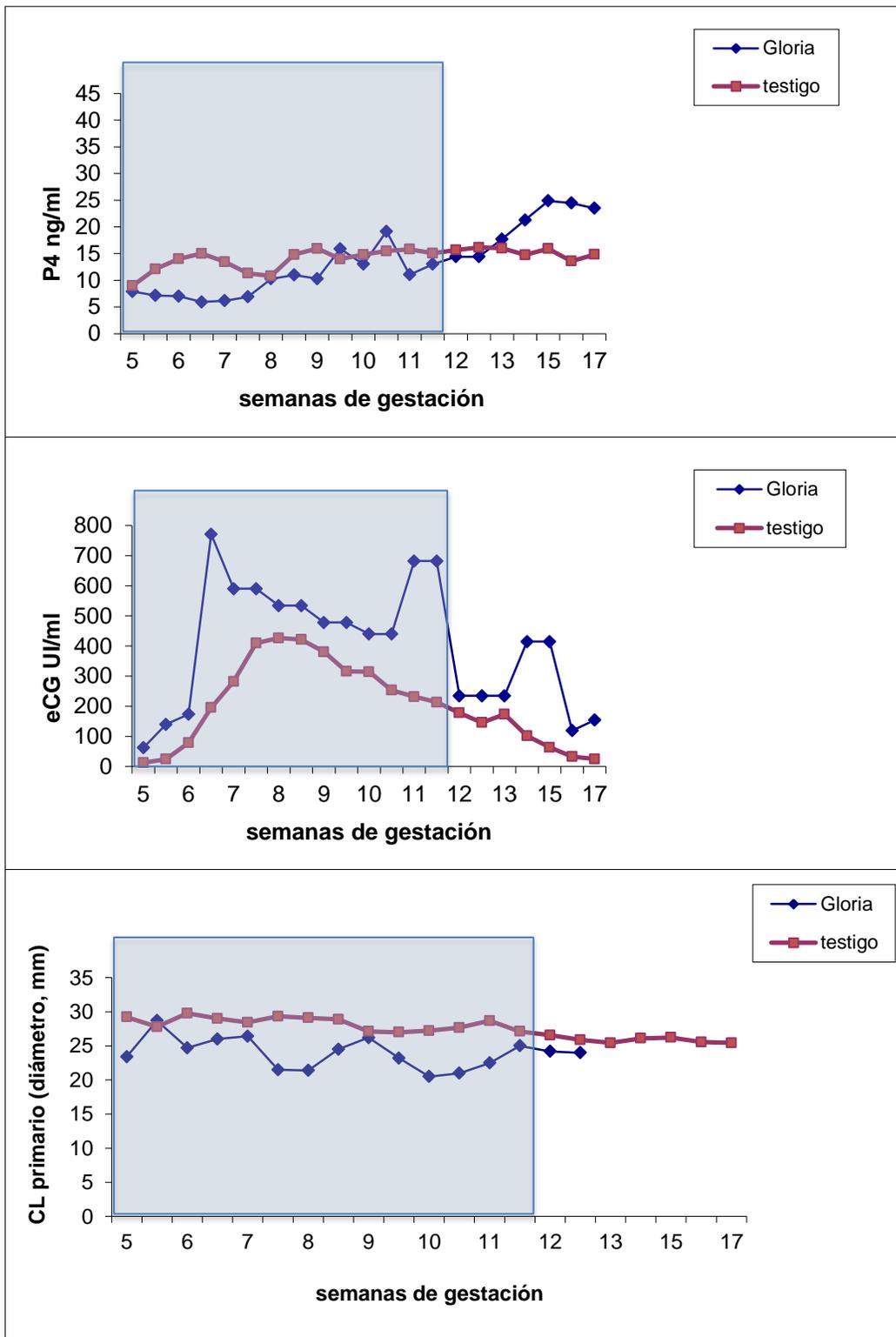


Figura 25. Concentraciones de progesterona, eCG, diámetro de cuerpo lúteo primario y volumen de FHAs en una gestación equina tratada con antarelix. Los óvalos indican el momento en el que se detectó por primera vez cada cuerpo lúteo accesorio. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.

En la yegua “Gloria” (figura 26) al inicio del estudio las concentraciones de progesterona eran bajas alcanzando su máxima concentración (19 ng/ml) en la semana 10 de gestación. En la semana 6, las concentraciones de eCG llegaron hasta las 771 UI/ml para después mantenerse por arriba del grupo control durante toda la evaluación. El cuerpo lúteo primario estuvo ligeramente por debajo del promedio, sin embargo, el volumen de los cuerpos lúteos accesorios mostró estar muy por arriba del grupo control entre la semana 8 y 9 de la gestación con la presencia de tres FHAs, sin embargo a pesar de la presencia de dichas estructuras la cantidad de progesterona que registro se mantuvo por debajo del promedio del grupo control.



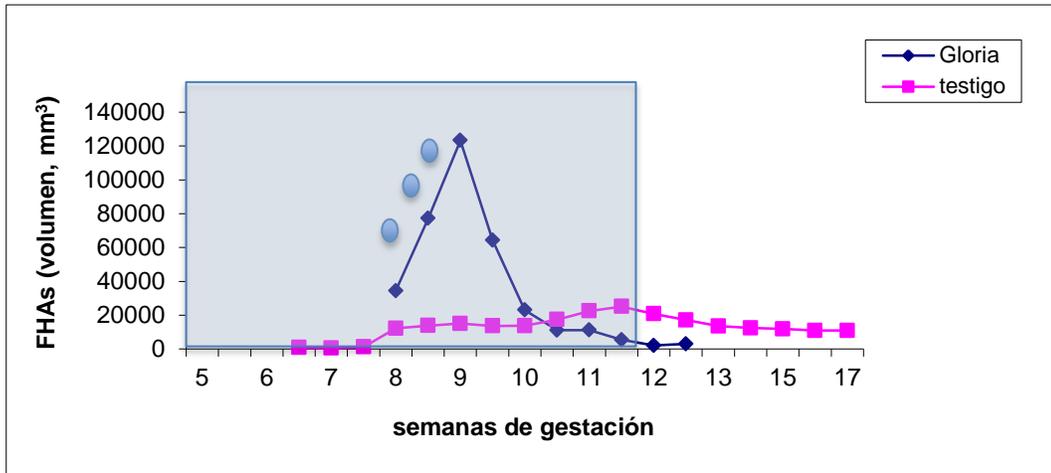


Figura 26. Concentraciones de progesterona, eCG, diámetro de cuerpo lúteo primario y volumen de FHAs en una gestación equina tratada con antarelix. Los óvalos indican el momento en el que se detectó por primera vez cada cuerpo lúteo accesorio. La parte sombreada indica el período de tratamiento con antarelix.

10. LITERATURA CITADA

Acosta TJ, Beg MA, Ginther OJ. 2004. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. *Biol Reprod* 71(2): 637-642.

Adams AP, Antczak DF. 2001. Ectopic transplantation of equine invasive trophoblast. *Biol Reprod* 64: 753-763.

Allen WR. The influence of fetal genotype upon endometrial cup development and PMSG and progestagen production in equids. 1975. *J Reprod Fertil Suppl* 23: 405-413.

Allen WR. 1982. Immunological aspects of the endometrial cup reaction and the effect of xenogeneic pregnancy in horse and donkeys. *J Reprod Ferti Suppl* 31: 57-942.

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

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

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

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

Allen WR, Moor RM. 1972. The origin of the equine endometrial cups. *J Reprod Fertil*. 1972. 313-316.

Allen WR, Stewart MJ. Equine chorionic gonadotrophin. In: McKinnon AO, Voss JL Editors. Equine Reproduction.. Lea y Fegiber, Philadelphia. 1993; 81-96.

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

Allen WR, Wilsher S. 2009. A review of implantation and early placentation in the mare. Placenta 30: 1005-1015.

Allen WR, Hamilton DW, Moor RM. 1973. Origin of the equine endometrial cups. 2. Invasion of the endometrium by trophoblast. Anat Rec. 177: 485-502.

Allen WR, Skidmore JA, Stewart F, Antczak DF. 1993. Effects of fetal genotype and uterine environment on placental development in equids. J of Reprod Fertil 97:55-60.

Al-zi'abi MO, Watson ED, Fraser HM. 2003. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. Reproduction 125: 259-270.

Armstrong DT, Grinwich DL. 1972. Blockade of spontaneous and LH-induced ovulation in rats by indomethacin, and inhibitor of prostaglandin biosynthesis. Prostaglandins 1(1): 21-28.

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

Becker SE, Johnson AL. 1992. Effects of gonadotropin-releasing hormone infused in a pulsatile or continuous fashion on serum gonadotropin concentrations and ovulation in the mare. J Anim Sci 70: 1208-1215.

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

Bergfelt DR, Adams GP. Ovulation and corpus luteum development. In Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO. *Current Therapy in Equine Reproduction*. Saunders Elsevier, St. Louis Missouri 2007 pp. 1-13.

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

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

Bielanski W, Ewy Z, Pigiowiowa H. Differences in the level of gonadotrophins in the serum of pregnant mares. *IIIrd. Int. Congr. Anim. Reprod. Cambridge*. 1956. 110-111.

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

Boeta AM. 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 doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México. 2008. México, D.F. México.

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

Boeta M, Zarco L. 2010. Endocrine alterations around the time of abortion in mares impregnated with donkey or horse semen. *Anim Reprod Sci* 121(1): 124-130.

Boeta M, Zarco L. 2012. Luteogenic and luteotropic effects during pregnancy in the mare. *Anim. Repr. Sci.* 130:57-62

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

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

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

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

Christenson LK., Devoto L. 2003. Cholesterol transport and steroidogenesis by the corpus luteum. *Reprod Biol and Endocrinol.* 90: 1-9.

Crump A, Donaldson WL, Miller JM, Kydd JH, Allen WR, Antczak DF. 1987. Expression of major histocompatibility complex (MHC) antigens on horse trophoblast. *J Reprod Fertil Suppl.* 35: 379-388.

Cuervo-Arango J, Newcombe JR. 2010. Risk factors for the development of hemorrhagic anovulatory follicles in the mare. *Reprod Dom Anim.* 45: 473-480.

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

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

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

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

Duijkers IJM, Klipping C, Willemsen WNP, Krone D, Schneider E, Niebch G, Hermann R. 1998. Single and multiple dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist cetrorelix in healthy female volunteers. *Human Reproduction* 13: 2392-2398.

Ealy AD, Eroh ML, Sharp DC. 2010. Prostaglandin H synthase type 2 is differentially expressed in endometrium based on pregnancy status in pony mares and responds to oxytocin and conceptus secretions in explant culture. *Anim Reprod Sci* 188: 575-589.

Evans MJ, Irvine CHG. 1975. Serum concentrations of FSH, LH and progesterone during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. *J Reprod Fert* 23: 193-200.

Freund, J.E. *Statistics. A First Course. Third Edition.* Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, N.J. 1981.

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

Ginther OJ. Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects, 2nd. Ed. Cross plain: Equiservices. 1992. pp. 252,253, 419-426, 434-445.

Ginther OJ, Gastal MO, Beg MA. 2006. Conversion of a viable preovulatory follicle into a hemorrhagic anovulatory follicle in mares. Anim Reprod. 3(1):29-40.

Ginther OJ, Gastal MO, Beg MA. 2007. Incidence, endocrinology, vascularity and morphology of hemorrhagic anovulatory follicles in mares. J Eq Vet Sci.27(3): 130-138.

Griffin PG, Ginther OJ. 1990. Uterine contractile activity in mares during the estrous cycle and early pregnancy. Theriogenology 34(1): 47-56

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

Halmos G, Schally AV, Pinski J, Vadillo-Buenfil M, Groot K. 1996. Down-regulation of pituitary receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in rats by LH-RH antagonist Cetrorelix. Medical Sciences 93: 2398-2402.

Halmos G, Schally AV. 2002. Changes in subcellular distribution of pituitary receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) after treatment with the LH-RH antagonist cetrorelix. Proc Natl Acad Sci 99(2): 961-965.

Hart PJ, Squires EL, Imel KJ, Nett TM. 1984. Seasonal variation in hypothalamic content of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), pituitary receptors for GnRH, and pituitary

content of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the mare. *Biol Reprod* 30: 1055-1062.

Hayes FJ, Taylor AE, Kathryn AM, Hall JE. 1998. Use of a gonadotropin-releasing hormone antagonist as a physiologic probe in polycystic ovary syndrome: Assessment of neuroendocrine and androgen dynamics. *J Clin Endocrinol and Metab* 83: 2343-2349.

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

Horvath JE, Toller GL, Schally AV, Bajo AM, Groot K. 2004. Effect of long-term treatment with low doses of the LHRH antagonist cetrorelix on pituitary receptors for LHRH and gonadal axis in male and female rats. *Proc Natl Acad Sci* 101: 4996-5001.

Jacek P, Tetsu Y, Karoly S, Kate G, Schally AV. 1993. Recovery of pituitaria.gonadal function in male rats after long-term suppression induced by a single injection of microcapsules of LH-RH antagonist cetrorelix (SB-75). *J Androl.* 14: 164-169.

Kartun K, Schwartz NB. 1987. Effects of a potent antagonist to gonadotropin-releasing hormone on male rats: Luteinizing hormone is suppressed more than follicle-stimulating hormone. *Biol of Reprod* 36(1): 103-108.

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

Killick S, Elstein M. 1987. Pharmacologic production of luteinized unruptured follicles by prostaglandin synthetase inhibitors. *Fertil Steril.* 47 (5): 773-777.

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

Magdolna K, Andrew VS, Balazs C, Zoltan R. 2001. Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist Cetrorelix down-regulates the mRNA expression of pituitary receptors for LH-RH by counteracting the stimulatory effect of endogenous LH-RH. *Proc Natl Acad Sci.* 98(4): 1829-1834.

Martin JL, Saltiel, Evans JW. 1989. Progesterone synthesis by different types of corpora lutea during the first 198 days of pregnancy. *Equine Vet Sci.* 9(2): 84-87.

Martin-Rosset, W. *La Alimentación de los Caballos.* Barcelona (España). Aedos. 1993:229.

McKinnon AO, Squires EL, Carnevale A, Hermetet MJ. 1988, Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipient and as model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. *Theriogenology.* 29(5): 1055-1063.

McNeilly AS, Crow WJ, Fraser HM. 1992. Suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion by gonadotrophin-releasing hormone antagonist does not affect episodic progesterone secretion or corpus luteum function in ewes. *J Reprod Fert* 96:865-874.

Millar RP. 2005. GnRHs and GnRH receptors. *Anim Reprod Sci* 88:5-28

Miller KF, Berg SL, Sharp DC, Ginther OJ. 1980. Concentrations of circulating gonadotropins during various reproductive states in mares. *Biol Reprod* 22: 744-750.

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

Ousey JC, Forhead AJ, Rossdale PD, Grainger L, Houghton E, Fowden AL. 2003. Ontogeny of uteroplacental progestagen production in pregnant mares during the second half of gestation. *Biol Reprod* 69; 540-548.

Ousey JC, Houghton ED, Grainger L, Rossdale PD, Fowden AL. 2005. Progestagen profiles during the last trimester of gestation in Thoroughbred mares with normal or compromised pregnancies. *Theriogenology* 63: 1844-1856.

Pawson AJ, McNeilly AS. 2005. The pituitary effects of GnRH. *Anim Reprod Sci* 88:75-94.

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

Ragni G, Vegetti W, Baroni E, Colombo M, Arnoldi M, Lombroso G, Crosignani PG. Comparison of luteal phase profile in gonadotrophin stimulated cycles with or without a gonadotrophin-releasing hormone antagonist. *Human Reproduction*. 16: 2258-2262.

Salhab AS, Amro BI, Shomaf MS. 2003. Further investigation on meloxicam contraceptivity in female rabbits: luteinizing unruptured follicles, a microscopic evidence. *Contraception* 67(6): 485-489.

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

Schwartz NB. Selective control of FSH secretion. In: *Role of Peptides and Proteins in Control of Reproduction*. Elsevier Press. 1983.: 193-213.

Schwartz NB, Rivier C, Rivier J. y Vale WW. 1985. Effect of gonadotropin-releasing hormone antagonist on serum follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone under conditions of singular follicle-stimulating hormone secretion. *Biol Reprod* 32: 391-398.

Sirois J, Dore M. 1997. The late induction of prostaglandin G/H synthase-2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process. *Endocrinology* 138(10): 4427-4434.

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

Squires EL, Heesemann CP, Webel SK, Shideler RK, Voss JL. 1983. Relationship of altrenogest to ovarian activity, hormone concentrations and fertility of mares. *J Anim Sci* 56: 901-910.

Stewart F, Lennard SN, Allen WR. 1995. Mechanisms controlling formation of the equine chorionic girdle. *Biol Reprod Monograph Series*. 1: 151-159.

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

Sugino H, Bousfield GR, Moore WT, Ward DN. 1987. Structural studies on equine glycoprotein hormones. Amino acid sequence of equine chorionic gonadotropin beta-subunit. *J Biol Chem* 262: 8603-8609.

Ulker H, Gant BT, Avila DM, Reeves JJ. 2001. LHRH antagonist decreases LH and progesterone secretion but does not alter length of estrous cycle in heifers. *J Anim Sci* 79: 2902-2907.

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.

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

Watson ED, Sertich PL. 1990. Secretion of prostaglandins and progesterone by cells from corpora lutea of mares. *J. Reprod. Fertil* 88:223-229.

Watson ED., Pedersen HG, Thomson SRM, Fraser HM. 2000. Control of follicular development and luteal function in the mare: Effects of a GnRH antagonist. *Theriogenology* 54(4):599-609

Zanella EL, Lunstra DD, Wise TH, Kinder JE., Ford JJ. 2000. GnRH antagonist inhibition of gonadotropin and steroid secretion in boars in vivo and steroid production in vitro. *J Anim Sci.* 78: 1591-1597.

Zarco L, Boeta M. Reproducción Equina, Segunda Edición. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 2000.