



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFFECTO DE UN ANTAGONISTA DE GnRH SOBRE LA DINÁMICA FOLICULAR Y LOS
NIVELES SÉRICOS DE FSH EN YEGUAS CON GESTACIÓN EQUINA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MVZ. ANA IRIS MOTA TORRES

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Ángel Rosendo Pulido Albores. FMVZ-UNAM

Dr. Gerardo Quiróz Rocha. FMVZ-UNAM

Dr. Joao Brandao Rodrigues. UNIVERSIDADE LUSÓFONA- PORTUGAL

CD.MX

NOVIEMBRE 2016



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.

Ana Iris Mota Torres

DEDICATORIAS

A mi Dios

Que siempre ha sustentado mi mano, por darme la serenidad y la cordura para lidiar con las situaciones difíciles de la vida y por permitirme vivir y disfrutar los momentos de gozo acompañada de mi familia.

A mi familia

Sele

La mejor madre del mundo, nunca he dudado del gran amor que me tienes, porque sin ti yo no sería nada. Me llena de orgullo ser tu hija.

Viejito

Gracias por acompañarme y apoyarme en este proceso, que si bien ha sido largo hoy rinde frutos.

Ale

Gracias por preocuparte siempre por mi bienestar y por ser el mejor amigo que cualquiera pudiese desear, no recuerdo un solo momento de mi vida en el que te hayas separado de mi lado y le doy gracias a Dios por haberme dado una nueva oportunidad de vida para seguir compartiendo contigo experiencias que nos fortalecen. Vienen cosas buenas hermanito.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Adry por compartirme de tu luz, por ser esa persona que me ha apoyado incondicionalmente y también por defenderme siempre incluso de mi misma, por tu fortaleza, tu temple y el cariño y consideraciones que tú y tu familia me tienen.

Elena, por hacerme reír y reflexionar, por siempre brindarme una sonrisa y un abrazo cálido, por compartir tus historias conmigo.

A ambas por ser un pilar fundamental en este trabajo, sin ustedes me hubiese sido más difícil alcanzarlo, gracias por los consejos, comidas, bailes y en especial por alegrarme y escucharme siempre que lo necesito, por su amistad.

A Jeremías, "Si bien, tener una historia bella que contar es algo que reconforta el espíritu, más lo es, poder vivirla", por ser mi estrella.

A Clara por hacerme reír a carcajadas, por ser como un hermano y compartir tu vida y esencia conmigo, por estar siempre al pendiente y apoyarnos incondicionalmente a "super" y a mí. Por ser más que amigo, familia. Te extraño.

A Voldemort por ser un amigo incondicional, por apoyarme siempre y creer en mí y en mis sueños.

Anaí, Lau y Ale Elias, porque la distancia y el tiempo no son nada cuando tienes buenas amigas, las quiero tanto.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la UNAM, Institución la cual me permitió la preparación y conclusión de mis estudios de posgrado, por abrirme las puertas de su mundo y por nunca dejarme sola, es un orgullo ser parte de ti.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), no solo por el apoyo financiero para la realización de mis estudios de posgrado, sino por la colaboración de todas las personas involucradas en mi caso.

Al Dr. Ángel Pulido, por ser más que un tutor, un buen amigo y en ocasiones un padre, por nunca perder la fe en mí y apoyarme en todo momento, siempre lo llevaré en mi corazón.

A la Dra. Myriam Boeta, por la oportunidad de este trabajo de investigación, por todo el apoyo y enseñanzas que me brindó, por ser un gran ejemplo.

Al Dr. Luis Zarco, por ayudarme aun cuando no nos conocíamos, por ser un ejemplo a seguir.

A los Doctores Gerardo Quiróz y Joao Rodrigues, por transmitirme tanto conocimiento y por ser empáticos conmigo, por creer en mí.

A los catedráticos del Departamento de Reproducción Animal por su apoyo y al CEIEPAA, centro que ha marcado mi vida.

"A research study is a product of not only a question and its pursuit,
but also the people, places and facilities available at the time."

(Hinrichs, 2016)

RESUMEN

EFFECTO DE UN ANTAGONISTA DE GnRH SOBRE LA DINÁMICA FOLICULAR Y LOS NIVELES SÉRICOS DE FSH EN YEGUAS CON GESTACIÓN EQUINA.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el desarrollo folicular, así como las concentraciones de FSH durante la aplicación de un tratamiento con un antagonista de GnRH (Antarelix) a yeguas gestantes entre las semanas 5 y 10 de gestación. Se utilizaron 14 yeguas criollas inseminadas con el mismo semental, a los 15 días se les realizó diagnóstico de gestación por ultrasonografía y al confirmar la gestación se asignaron al azar en tres tratamientos; el tratamiento 1 consistió en la administración del Antagonista de GnRH. Debido a los resultados obtenidos, este tratamiento se dividió en dos grupos: Anti GnRH_a (n=4) y Anti GnRH_b (n=4); el tratamiento 2 consistió en la administración del antagonista de GnRH, más la administración de hCG (n=3) como inductor de la ovulación al presentar las yeguas un folículo preovulatorio mayor a 35mm y las yeguas control (n=3). A partir del día 35 de gestación se administró el antagonista de GnRH "Antarelix" a una dosis de 0.01mg/kg IV diariamente por 7 días, para posteriormente aplicarse una dosis de 0.07mg/kg SC semanalmente durante 4 semanas más, en el grupo Anti GnRH+hCG se monitoreó la yegua por ultrasonografía y al momento de detectar un folículo mayor a 35mm, 24 horas después se administró hCG a dosis de 2,500 UI. Se monitoreó la dinámica folicular de todos los tratamientos. La determinación de FSH se llevó a cabo entre los días 35 y 81 de la gestación. A partir de la quinta semana se obtuvieron muestras sanguíneas por venopunción de la yugular dos veces por semana. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min y se mantuvieron en congelación hasta su procesamiento por enzimoimmunoensayo. Este experimento soporta la teoría de que los niveles de FSH disminuyen al administrarse el antagonista de GnRH afectando la dinámica folicular propia de la gestación equina.

Palabras clave: yegua, Antarelix, gestación, dinámica folicular, FSH

ABSTRACT

EFFECT OF GnRH ANTAGONIST OVER FOLLICULAR DYNAMICS AND SERUM LEVELS OF FSH IN PREGNANT MARES WITH EQUINE PREGNANCY

The aim of this work is to assess the follicular development as well as the FSH serum concentrations during a GnRH antagonist (Antarelix) treatment in pregnant mares carrying equine pregnancy between weeks 5-10 of gestation. 14 Pony mares clinically healthy were used, served with the same stallion, 15 days after insemination pregnancy diagnosis was performed; once the gestation is positive were randomly located in one of three treatments. Treatment 1 consisted in the administration of the GnRH antagonist. Due to the results obtained, this treatment was divided into two groups: Anti GnRH_a (n=4) and Anti GnRH_b (n=4); treatment 2 consisted in the administration of the GnRH antagonist, plus the administration of hCG (n=3) as an ovulation inductor when mares present a preovulatory follicle bigger than 35mm of diameter and the mares in control group (n=3). From day 35 of gestation was administered the GnRH antagonist "Antarelix" at a dose of 0.01mg/kg IV daily for 7 days then was given a dose of 0.07mg/kg sc weekly for 4 weeks more. In group Anti GnRH+hCG each mare was monitored by ultrasonography and at the time of a preovulatory follicle bigger than 35mm of diameter were detected, 24 hours after hCG was administered at a dose of 2,500 IU. The follicular dynamic of every mare in the treatment were monitored. The determination of FSH was carried out between days 35 and 81 of gestation. From the fifth week blood samples were obtained by venipuncture of the jugular vein twice a week. Blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min and remained in freezing until processing by enzyme immunoassay. This experiment supports the theory that the levels of FSH decrease when administered the GnRH antagonist affecting the follicular dynamics in the pregnant mare. No significant differences were found, we suggest further investigation.

Key words: mare, Antarelix, pregnancy, follicular dynamics, FSH.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	18
JUSTIFICACIÓN	19
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
HIPÓTESIS.....	20
REVISIÓN DE LA LITERATURA	21
1. GnRH.....	21
1.1. Receptores para GnRH	24
1.2. Análogos de GnRH.....	26
1.2.1. Antagonistas de GnRH.....	27
1.2.1.1. Antarelix	28
2. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal.....	30
2.1. Función hipotalámica	31
2.2. Función de la hipófisis y liberación de gonadotropinas	32
2.2.1. Hormonas gonadotrópicas.....	33
2.2.1.1. Hormona Folículo Estimulante.....	34
2.2.1.2. Hormona Luteinizante.....	34
3. Foliculogénesis.....	35
3.1. Mecanismo de ovulación.....	36
3.2. Manipulación farmacológica de la ovulación.....	37

4. Dinámica Folicular.....	38
4.1. Oleadas Foliculares.....	40
4.1.1. Emergencia, Selección y Dominancia Folicular	40
4.2. Atresia folicular.....	41
4.3. Folículos Anovulatorios Hemorrágicos (FAH's)	42
5. Gestación Temprana en la yegua	43
5.1. Reconocimiento materno de la gestación	45
5.2. Gonadotropina coriónica equina.....	45
5.2.1. Reacción de las copas endometriales	46
5.3. Cuerpo Lúteo en la Gestación.....	47
5.3.1. Resurgencia del cuerpo lúteo primario.....	47
6. Efectos de la gestación en la dinámica folicular	48
MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
MODELO CONCEPTUAL	49
LOCALIZACIÓN	51
POBLACIÓN.....	52
ULTRASONOGRAFÍA	52
TRATAMIENTO	53
DETERMINACIÓN DE FSH EN SUERO.....	53
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	54
RESULTADOS	55
1.Alteración de la dinámica folicular.....	56
2. Concentraciones séricas de FSH	64

3.Relación de las alteraciones en la dinámica folicular con los niveles séricos de FSH.....	66
DISCUSIÓN	69
CONCLUSIONES	73
ANEXOS.....	74
Comparaciones de Medias por grupo de FSH.	74
Resumen de la dinámica folicular y niveles séricos de FSH por yegua	75
LITERATURA CITADA	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del péptido de GnRH indicando las propiedades estructurales y funcionales de cada uno de los aminoácidos residuales	21
Figura 2. Regulación del eje hipotalámico-hipofisiario-ovárico.....	22
Figura 3. Topografía propuesta del receptor de GnRH, obsérvese los siete dominios transmembranales.....	24
Figura 4. Mecanismo de acción de los antagonistas de GnRH	27
Figura 5. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal, estímulos y principales hormonas involucradas.....	30
Figura 6. Esquema de los mecanismos propuestos durante la ovulación	37
Figura 7. Desarrollo folicular durante el ciclo estral de la yegua. Etapas, procesos y hormonas predominantes en circulación periférica.....	39
Figura 8. Modelo conceptual de EFECTO DE UN ANTAGONISTA DE GnRH SOBRE LA DINÁMICA FOLICULAR Y LOS NIVELES SÉRICOS DE FSH EN YEGUAS CON GESTACIÓN EQUINA.....	50
Figura 9. Localización del antiguo Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agrícola y Ganadera (CEIEPAG) de la FMVZ.....	51

Figura 10. Resumen de la dinámica folicular y estructuras lúteas del subgrupo Anti GnRHa	57
Figura 11. Resumen de la dinámica folicular del subgrupo Anti GnRHb.....	59
Figura 12. Resumen de la dinámica folicular y estructuras lúteas del subgrupo Anti GnRH+hCG.....	60
Figura 13. Resumen de la dinámica folicular y estructuras lúteas del grupo Control.....	62
Figura 14. Relación de la dinámica folicular con la secreción de FSH en las yeguas del subgrupo Anti-GnRHa.....	66
Figura 15. Relación de la dinámica folicular con la secreción de FSH en las yeguas del subgrupo Anti-GnRHb.....	67
Figura 16. Relación de la dinámica folicular con la secreción de FSH en las yeguas del subgrupo Anti-GnRH+hCG	68
Figura 17. Relación de la dinámica folicular y estructuras lúteas con la secreción de FSH en las yeguas del grupo Control	69
Figura 18. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 1. "Zapatito" perteneciente al subgrupo Anti GnRHa.....	76

Figura 19. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 2. "Lady Xoc" perteneciente al subgrupo Anti GnRHb.....	77
Figura 20. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 3. "Valentina" perteneciente al subgrupo Anti GnRHb.....	78
Figura 21. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 4. "Diez" perteneciente al subgrupo Anti GnRHb.....	79
Figura 22. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 5. "Lady Di" perteneciente al subgrupo Anti GnRHb.....	80
Figura 23. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 6. "Candela" perteneciente al subgrupo Anti GnRHb.....	81
Figura 24. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 7. "Trece" perteneciente al subgrupo Anti GnRHb.....	82
Figura 25. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 8. "Alfa 1" perteneciente al subgrupo Anti GnRHb.....	83
Figura 26. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 9. "Dos" perteneciente al subgrupo Anti GnRH+hCG.....	84
Figura 27. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 10. "Nueve" perteneciente al subgrupo Anti GnRH+hCG.....	85

Figura 28. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 11. "Tres" perteneciente al subgrupo Anti GnRH+hCG.....86

Figura 29. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 12. "Alfa 2" perteneciente al subgrupo Control.....87

Figura 30. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 13. "Rumba" perteneciente al subgrupo Control.....88

Figura 31. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 14. "Samba" perteneciente al subgrupo Control..... 89

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Redistribución de los tratamientos en subgrupos de acuerdo a la presentación de los resultados.....	55
Cuadro 2. Luteal Gland Terminology Used During the Estrous Cycle and Pregnancy in the Mare.....	56
Cuadro 2. Medias de los niveles séricos de FSH por subgrupo por semana.	64
Cuadro 4. Comparaciones por pares de las medias marginales estimadas basadas en la escala original de la variable dependiente. No hay diferencia entre las medias ($p=.05$).....	75
Cuadro 9. Medias por semana de FSH de yegua 1 "Zapatito" perteneciente al subgrupo Anti GnRH _a	76
Cuadro 10. Medias por semana de FSH de yegua 2 "Lady Xoc" perteneciente al subgrupo Anti GnRH _b	77
Cuadro 11. Medias por semana de FSH de yegua 3 "Valentina" perteneciente al subgrupo Anti GnRH _b	78
Cuadro 12. Medias por semana de FSH de yegua 4 "Diez" perteneciente al subgrupo Anti GnRH _a	79

Cuadro 13. Medias por semana de FSH de yegua 5 "Lady Di" perteneciente al subgrupo Anti GnRHb.....	80
Cuadro 14. Medias por semana de FSH de yegua 6 "Candela" perteneciente al subgrupo Anti GnRHb.....	81
Cuadro 15. Medias por semana de FSH de yegua 7 "Trece" perteneciente al subgrupo Anti GnRHb.....	82
Cuadro 16. Medias por semana de FSH de yegua 8 "Alfa 1" perteneciente al subgrupo Anti GnRHb.....	83
Cuadro 17. Medias por semana de FSH de yegua 9 "Dos" perteneciente al subgrupo Anti GnRH+hCG.....	84
Cuadro 18. Medias por semana de FSH de yegua 10 "Nueve" perteneciente al subgrupo Anti GnRH+hCG.....	85
Cuadro 19. Medias por semana de FSH de yegua 11 "Tres" perteneciente al subgrupo Anti GnRH+hCG.....	86
Cuadro 20. Medias por semana de FSH de yegua 12 "Alfa 2" perteneciente al subgrupo Control.....	87
Cuadro 21. Medias por semana de FSH de yegua 13 "Rumba" perteneciente al subgrupo Control.....	88

Cuadro 22. Medias por semana de FSH de yegua 14 "Samba" perteneciente al subgrupo Control.....	89
--	----

INTRODUCCIÓN

EFFECTO DE UN ANTAGONISTA DE GnRH SOBRE LA DINÁMICA FOLICULAR Y LOS NIVELES SÉRICOS DE FSH EN YEGUAS CON GESTACIÓN EQUINA

En la yegua el desarrollo folicular se presenta en forma de oleadas durante el ciclo estral, gestación y los periodos de transición estacional (primavera y otoño) entre las épocas anovulatorias (Bergfelt, 2009).

En la primera mitad de la gestación la dinámica folicular se caracteriza por un periodo inicial de actividad variable (entre los días 11 y 40) evidenciado por el desarrollo esporádico de oleadas "mayores" y "menores"; seguido por un decremento en la actividad folicular entre los días 50 y 140 de gestación y por lo general no evidenciando folículos mayores de 15 mm (Donadeu & Pedersen, 2008).

La GnRH hormona cuya secreción puede ser influenciada por factores hormonales, estrés y estacionalidad se considera como la iniciadora y reguladora central de la cascada reproductiva (Clarke & Pompolo, 2005; Millar, 2005). Esta hormona es liberada mediante pulsos al sistema porta hipofisiario hacia la adenohipófisis (Zarco, 2010) para estimular la biosíntesis y secreción de LH y FSH, mediante la unión a receptores específicos de la membrana plasmática de los gonadotropos (Gobello, 2007).

Endocrinamente, la gestación temprana de la yegua se caracteriza por presentar niveles basales de Hormona Luteinizante (LH) debido a la retroalimentación negativa ejercida por el aumento de progesterona (P4) proveniente del cuerpo lúteo (CL) primario. La FSH sigue un patrón de secreción bimodal cada 10-12 días siendo capaz de inducir desarrollo folicular (Calderon López et al., 2012; Castro et al., 2015; Mihm & Evans, 2008; Raz & Aharonson-Raz, 2012).

Conocer la mayor cantidad de interrogantes y aspectos particulares en la especie equina ha llevado a la investigación reproductiva enfocarse en aspectos

como endocrinología (Adams, et al., 1986; Allen, 1984; Altermatt, 2012; Castro, 2015; Daoud, 2014), fisiología (Argo & Turnbull, 2010; Bergfelt, 2009) y dinámica folicular (Alves et al., 2016, Araujo, 2009; Bergfelt, 1993).

Esta situación ha llevado a emplear los antagonistas de GnRH, para estudiar las interrelaciones entre la secreción de GnRH con las gonadotropinas y su efecto en el desarrollo folicular y ovulación, (A. M. Boeta, et al., 2014). La administración de estas sustancias disminuye la secreción de GnRH y por lo tanto de gonadotropinas, (Watson, et al., 2000) observando diferencias en los patrones de secreción de las mismas de acuerdo a la dependencia de éstas a la GnRH (Briant, et al., 2003; Copperman & Benadiva, 2013).

El uso de Antarelix en yeguas representa ventajas por sobre otros antagonistas de GnRH (Jörg Bernhard Engel, et al., 2005), ya que además de ser un potente inhibidor de GnRH, 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; Calderon López et al. 2012).

JUSTIFICACIÓN

En yeguas tratadas con antarelix la secreción de FSH disminuye alrededor del 50% sugiriendo que la secreción de FSH es en parte controlada por la GnRH (Watson et al., 2000). Evidenciando la alteración de la dinámica folicular bajo protocolos de administración de antagonistas de GnRH (Veloz-Mochca, 2016).

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de un antagonista de GnRH sobre la dinámica folicular y los niveles séricos de FSH en yeguas con gestación equina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Confirmar la reducción de la actividad folicular asociada a la disminución de la secreción de gonadotropinas por la administración del antagonista de GnRH en yeguas gestantes.
- b) Evaluar los niveles séricos de FSH en yeguas con gestación equina tratadas con un antagonista de GnRH.
- c) Relacionar la disminución de la actividad folicular con los niveles séricos de FSH.

HIPÓTESIS

La administración de un antagonista de GnRH a yeguas con gestación equina afectará negativamente el desarrollo folicular normal en la gestación y disminuirá los niveles séricos de FSH, provocando asimismo la disminución en la formación de cuerpos lúteos suplementarios.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

1. GnRH

La Hormona Liberadora de Gonadotropinas es un decapeptido (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) (Figura 1), considerado como el iniciador central de la cascada reproductiva. Se secreta por neuronas especializadas localizadas en el área preóptica y ventromedial del hipotálamo anterior y mediobasal (Zarco, 2010) a partir de un polipéptido precursor mediante un proceso enzimático y es almacenado en gránulos que son transportados mediante axones hasta la zona externa de la eminencia media. La producción de GnRH puede ser influenciada por factores hormonales, estrés y estacionalidad (Clarke & Pompolo, 2005; Millar, 2005).

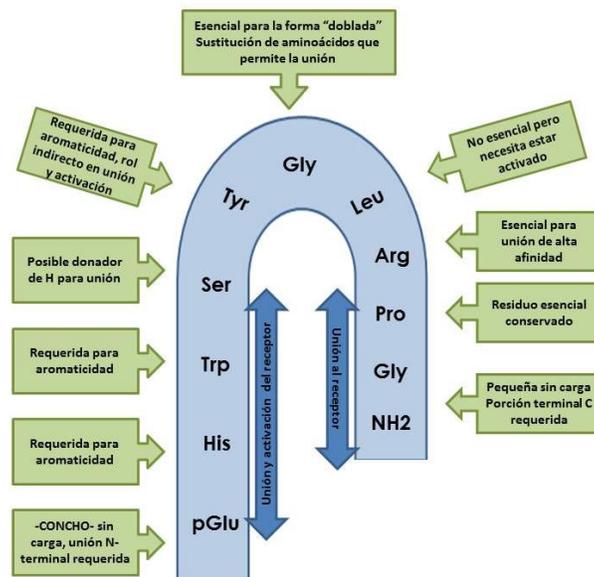


Figura 1. Representación esquemática del péptido de GnRH indicando las propiedades estructurales y funcionales de cada uno de los aminoácidos residuales. Modificado de A.M. Padula, GnRH analogues—agonists and antagonists, *Animal Reproduction Science* 88 115–126.

Esta hormona es liberada mediante pulsos al sistema porta hipofisiario hacia la adenohipófisis (Zarco, 2010) para estimular la biosíntesis y secreción de LH y FSH, mediante la unión a receptores específicos de la membrana plasmática de los gonadotropos. (Gobello, 2007). Mientras que la LH se libera en respuesta a la secreción pulsátil de GnRH, con la FSH actúa solo como un factor permisivo debido a que otras hormonas actúan directamente sobre la adenohipófisis y modifican el patrón de secreción de FSH, resultando en un patrón pulsátil menos distintivo que el de la LH y teniendo una menor correlación con la frecuencia pulsátil de la GnRH (Figura 2) (Krsmanovic et al., 2010); Zarco, 2010).

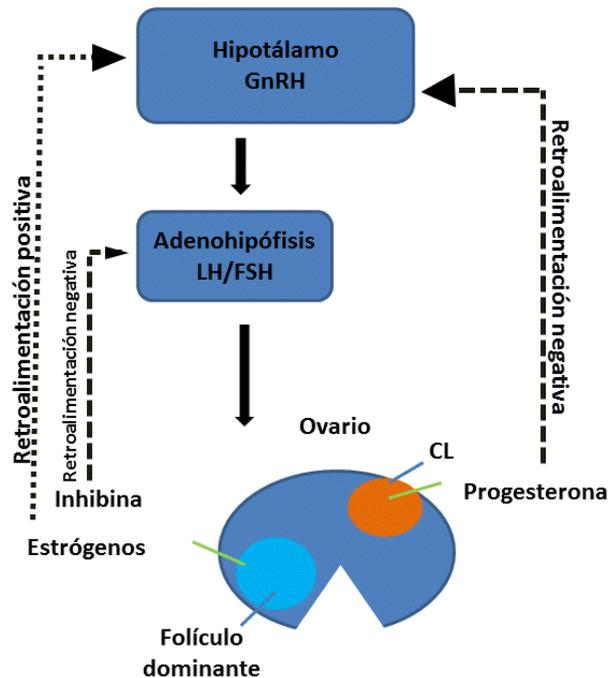


Figura 2. Regulación del eje hipotalámico-hipofisiario-ovárico. Modificado de Fisiología Veterinaria e Introducción a la fisiología de los procesos productivos, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Fisiología y Nutrición (2010), Organización del Sistema Neuroendocrino a partir de ejes p 219

La GnRH no solo causa la producción *de novo* de gonadotropinas sino que induce la secreción de los gonadotropos pituitarios permitiéndoles la regularización y sincronización de los ciclos reproductivos (Kraus et al., 2001; Krsmanovic et al. 2010).

A pesar de que la GnRH aislada de los mamíferos juega un papel primordial en la investigación y comprensión de los ciclos reproductivos, se han identificado 23 formas estructuralmente diferentes en vertebrados. Estos individuos poseen por lo menos dos y por los general tres formas de GnRH, (Millar, 2005) distribuidas en gran variedad de tejidos y teniendo diversas funciones, incluyendo neuroendocrinas, parácrinas y autócrinas. Estas formas de GnRH están involucradas en roles de neurotransmisión y como neuromoduladores en el sistema nervioso central y periférico marcando así la pauta para la investigación de esta glicoproteína así como de sus análogos (Millar, 2003).

En la yegua, la mayoría de los pulsos de GnRH están seguidos por pulsos de LH y más de 80% de estos son acompañados por un pulso subsecuente de FSH. La frecuencia en los pulsos de GnRH se cambia de acuerdo a la fase del ciclo estral siendo baja durante la fase lútea (aprox. cada 120 minutos) contrastando con el día de la ovulación donde ocurren cada 30 min. aproximadamente (Aurich, 2011).

1.1. Receptores para GnRH

El hipotálamo de los mamíferos secreta diferentes factores tanto de liberación como de inhibición y de estos, es la GnRH la que juega el rol más importante en la reproducción (Schäfer-Somi et al., 2015). La GnRH actúa principalmente en la adenohipófisis a través de un receptor de membrana específico (Kraus et al., 2001). Este receptor es una sialoglucoproteína y pertenece a un grupo de receptores unidos a proteínas G (Shukla, 2016). Está conformado por siete hélices hidrofóbicas localizadas dentro de la membrana plasmática además de tres subunidades; α , β y γ . Estructuralmente el receptor de GnRH presenta un dominio amino terminal ubicado en el exterior de la célula que incluye tres asas intra y extra celulares y un dominio carboxilo terminal en el exterior (Figura 3) (Zarco, 2010).

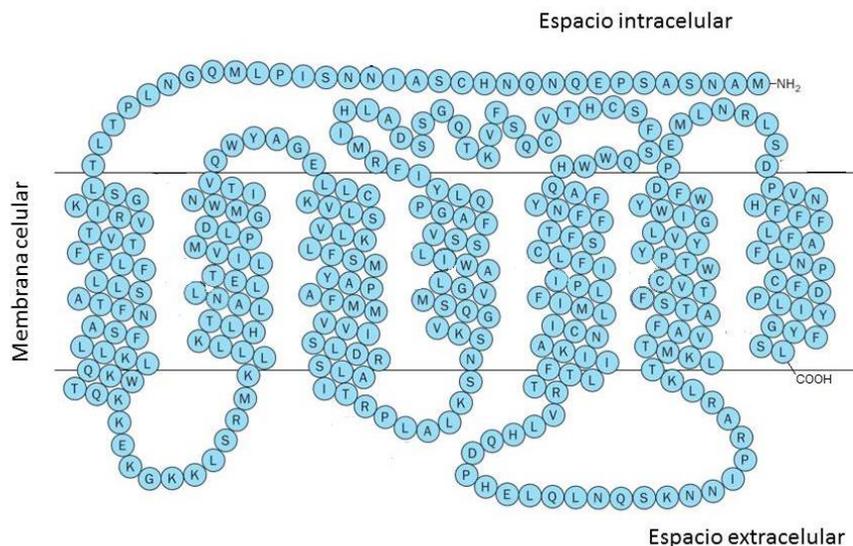


Figura 3. Topografía propuesta del receptor de GnRH, obsérvese los siete dominios transmembranales. Modificado de Tarlatzis B.C., Direct ovarian effects and safety aspects of GnRH agonists and antagonists, Reproductive BioMedicine Online, 2002.

Los residuos amino-terminales de GnRH están involucrados en la activación y modificación de las características del receptor, haciendo posible la producción de análogos (Millar, 2003).

Existe una gran variedad de proteínas G, algunas actúan activando (Gs o G-estimuladora) o inhibiendo al receptor (Gi o G-inhibitoria), es decir, al acoplarse un ligando al receptor, este sufre una modificación conformacional lo que permite interactuar con su respectiva proteína G. Si se trata de un ligando que activa la adenilato ciclasa, su receptor se asociará con Gs, mientras que si se trata de uno que la inhibe, su receptor lo hará con Gi, resultando en la producción o disminución de AMPc respectivamente (Krsmanovic et al., 2010; Zarco, 2010).

Los ligandos que han demostrado interacción con GPCRs incluyen neurotransmisores, hormonas, fosfolípidos, odorantes y mitógenos, es por esto que los GPCRs pueden iniciar un gran número de procesos celulares, incluyendo la proliferación y diferenciación, así como funciones especializadas tales como la exocitosis, la activación de canales de iones, y la expresión génica (Kraus et al., 2001).

A pesar de que se ha descrito el sistema adenilato-ciclasa para la activación de los receptores acoplados a proteína G, la activación del receptor de GnRH para la liberación de gonadotropinas es mediante el sistema llamado fosfatidilinositol-calcio, el cual corresponde a la activación de la proteína cinasa C a través del rompimiento de fosfolípidos de membrana para producir segundos mensajeros como el fosfatidilinositol (IP) y diacilglicerol (DAG) (Huirne & Lambalk, 2001). El primero conduce a la activación de proteína cinasa c y el segundo a la producción de AMPc y a la liberación de calcio intracelular, generando un incremento del Ca^{++} del citoplasma. Estos eventos dan lugar a la síntesis y secreción de LH y FSH (Huirne & Lambalk, 2001; Kraus et al., 2001).

1.2. Análogos de GnRH

Como se han mencionado con anterioridad, la GnRH es la hormona maestra en el control de la reproducción en los mamíferos, desde la elucidación de la secuencia de aminoácidos de la GnRH porcina con el subsecuente descubrimiento de que esta secuencia se conserva en todos los mamíferos, el interés en esta hormona se ha centrado en el desarrollo de modificaciones de su secuencia para crear moléculas con más potencia y efectos en pro de la fertilidad. El desarrollo de estas sustancias, llamadas análogos depende en gran medida de los avances de la investigación relacionada a la síntesis de péptidos (Padula, 2005).

Los análogos de GnRH incluyen agonistas y antagonistas, son producidos mediante la sustitución de aminoácidos en la molécula de GnRH (Gobello, 2007) y compiten con la GnRH endógena por los sitios de unión al receptor interfiriendo con la producción y secreción de hormonas gonadotrópicas (J. B. Engel, et al., 2005). El desarrollo de análogos de GnRH ha avanzado velozmente y los nuevos compuestos son comúnmente utilizados en enfermedades dependientes de hormonas sexuales como el cáncer y endometriosis (J. B. Engel et al., 2005).

Desde el aislamiento y caracterización de la GnRH en 1971, se han desarrollado más de 3000 análogos. El interés en los análogos sintéticos radica en la creación de una molécula con mayor potencia y una vida media mayor que la GnRH endógena, esto es posible incrementando la afinidad por los receptores y disminuyendo la degradación y eliminación (Gobello, 2007).

Estudios comparativos entre análogos de GnRH sugieren que el uso de antagonistas está asociado con un estímulo de menor duración que los agonistas, disminuyendo la incidencia del síndrome de hiperestimulación ovárica (Cota Ana Marcia M, 2012).

1.2.1. Antagonistas de GnRH

Los análogos antagonistas de GnRH se han sintetizado artificialmente desde hace años y su desarrollo ha avanzado de la mano con el de los superagonistas de GnRH (Padula, 2005). Las características esenciales de los primeros es la alta afinidad por el GnRH-R al que se unen sin activar debido a las bajas propiedades histaminérgicas y a la resistencia a la degradación enzimática (Barri, et al., 2002).

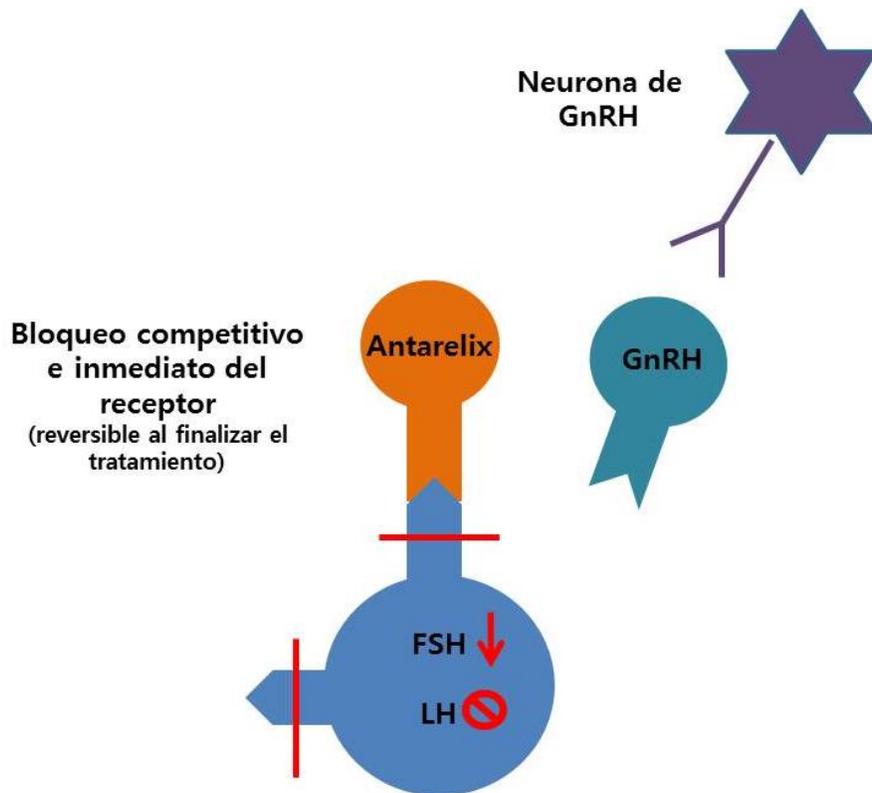


Figura 4. Mecanismo de acción de los antagonistas de GnRH. Modificado de Huirne J., Gonadotropin-releasing-hormone-receptor antagonists, THE LANCET, Vol 358, November 24, 2001.

Los antagonistas de GnRH actúan de manera inmediata y reversible bloqueando los receptores pituitarios de GnRH y uniéndose a sus receptores competitiva y selectivamente.

Estudios *in vitro* que evalúan la capacidad de unión a estos receptores han demostrado afinidad mayor que la de la hormona endógena nativa (J. B. Engel, et al., 2006) y producen una rápida disminución en los niveles séricos de FSH y LH. Estos tratamientos se han usado en yeguas ya sea para controlar la secreción de LH y por consiguiente la ovulación y para entender el rol de las gonadotropinas en la ovulación y mantenimiento del cuerpo lúteo (Briant et al., 2003). La potencia de los antagonistas estas, es evaluada de la misma forma que con los agonistas; utilizando un ensayo para evidenciar la afinidad de la molécula por el receptor y su unión al mismo (Padula, 2005).

1.2.1.1. Antarelix

Antarelix (Ac-d-Nal, d-Phe(0pCl), d-Pal, Ser, Tyr, d-Hci, Leu, Lys, Pro, d-Ala-NH₂) es una molécula soluble en agua cuya actividad antagonista de GnRH se ha demostrado en modelos *in vitro* e *in vivo*; cuya actividad farmacológica y sus propiedades histaminérgicas han llevado a su investigación y desarrollo clínico (Deghenghi, et al., 1993).

Muchos métodos se han usado para controlar y estudiar la ovulación en las yeguas, ya que los protocolos efectivos para otras especies no han obtenido resultados favorables en éstas (Briant et al., 2003).

La administración de antarelix ha demostrado la disminución en los niveles séricos de gonadotropinas (Brüssow et al., 2001, 2000), permitiendo investigar y comprender algo más de la endocrinología reproductiva en esta especie. En yeguas tratadas con antarelix la secreción de LH disminuye de 90 a 100%, sin embargo la de FSH disminuye solo alrededor del 50% sugiriendo que la

secreción de FSH solo es en parte controlada por la GnRH (Watson et al., 2000); un estudio encabezado por Hinojosa (2001) al igual que Weltzien (2014) enuncian la hipótesis de que la señalización por parte del sistema activina/inhibina/folistatina actúa en conjunto con los estrógenos y testosterona para controlar la secreción de FSH haciéndola menos sensible al efecto del antagonista de GnRH (Hinojosa et al., 2001).

2. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal

En los mamíferos el mayor regulador del eje reproductivo es la GnRH, producida por neuronas especializadas en el hipotálamo. Esta hormona a su vez regula la secreción de FSH y LH en la hipófisis anterior estimulando la producción de esteroides sexuales que regulan en gran medida el comportamiento sexual (Bergfelt, 2009) y promueven la gametogénesis (Smale, Heideman, & French, 2005).

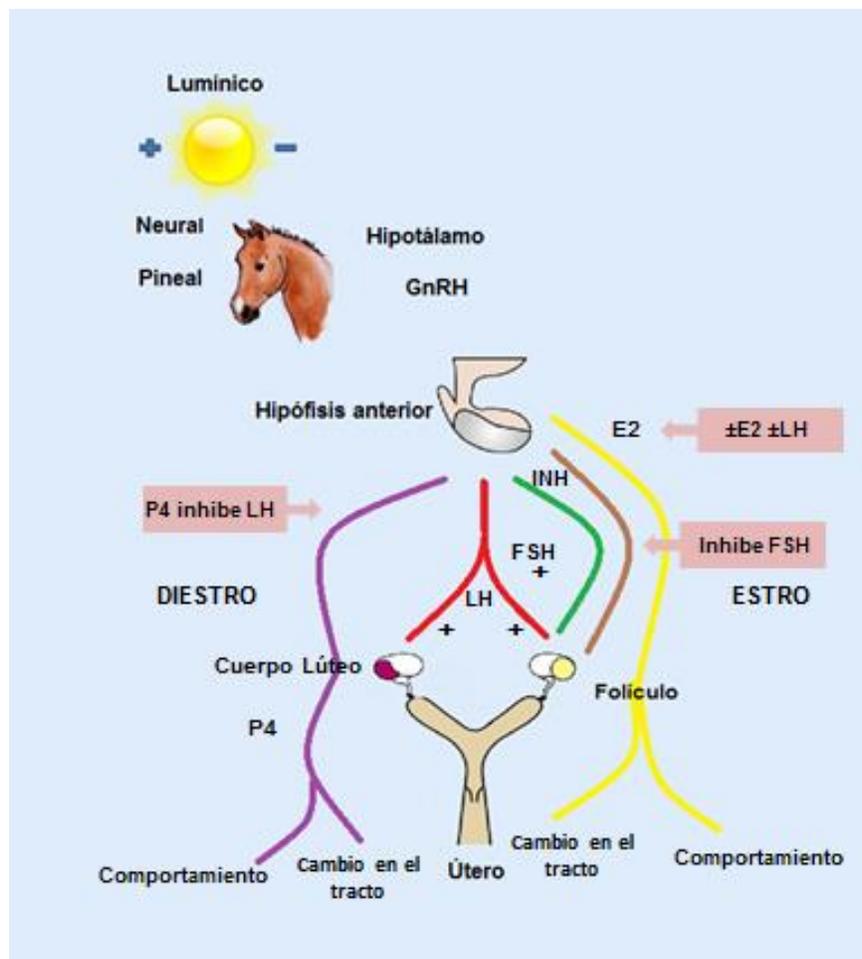


Figura 5. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal, estímulos y principales hormonas involucradas. Modificado de Equine Breeding Management and Artificial Insemination, Bergfelt, Don R., Saunders, 2009

El estatus reproductivo depende de los patrones de secreción de GnRH, los cuales están influenciados por disposición de alimentos, variaciones ambientales y estacionalidad (Bergfelt, 2009). La estacionalidad va de la mano con los cambios en el fotoperiodo donde la señal neuroendocrina de la luz es procesada por una compleja vía en la que es percibida por el núcleo supraquiasmático (SNC) (figura 4) que regula los ritmos biológicos. Este estímulo lumínico estimula la síntesis y secreción de melatonina por la glándula pineal durante la noche y esta a su vez regula la secreción de GnRH (Smale et al., 2005). La cantidad de horas luz influye en la secreción de GnRH en las especies fotoperiódicas, en los equinos, el aumento de las horas luz produce una disminución de la liberación de melatonina, permitiendo la liberación de GnRH y estimulando la biosíntesis de FSH y LH (Gigli I, 2006).

2.1. Función hipotalámica

La importancia fisiológica del hipotálamo radica en su capacidad para la coordinación de las funciones de regulación o transformación de las pulsaciones en comportamientos orientados. El hipotálamo es quien establece una relación estrecha y de alta especificidad entre los dos sistemas de comunicación intercelular de los organismos: el sistema nervioso, y el sistema hormonal (Zarco, 2010).

El hipotálamo equino se encuentra localizado medialmente sobre la parte ventral del diencefalo formando el piso del tercer ventrículo, es en esta región del encéfalo donde se produce la GnRH (Bergfelt, 2009).

Como ya se mencionó antes, el 80% de los pulsos de GnRH son seguidos por los pulsos de LH desde la hipófisis y la secreción de FSH sigue un patrón bimodal con oleadas cada 10-12 días (Calderon López et al., 2012; Castro et al., 2015; Mihm & Evans, 2008; Raz & Aharonson-Raz, 2012). Los cambios de frecuencia en los pulsos de secreción de gonadotropinas, se relacionan con la

etapa del ciclo estral, debido a que la liberación hipotalámica de GnRH, es modulada por mecanismos de retroalimentación (Krsmanovic et al., 2010)).

2.2..Función de la hipófisis y liberación de gonadotropinas

La hipófisis es una estructura que se encuentra suspendida por debajo del hipotálamo y yace en una cavidad en el piso del cráneo. Ésta se compone por dos lóbulos: uno nervioso (hipófisis posterior/neurohipófisis) y uno glandular o endocrino (hipófisis anterior/adenohipófisis). La adenohipófisis está compuesta por cinco tipos celulares: los corticotropos, tirotropos, gonadotropos, somatotropos y lactotropos, en esta estructura además se distinguen tres zonas: la pars tuberalis, la pars terminalis y la pars intermedia (Zarco, 2010).

La LH y la FSH son producidas en células llamadas gonadotropos, que se localizan en la pars distalis así como en la pars tuberalis de la hipófisis equina y pueden constituir hasta 20% de las células de la adenohipófisis. Existen subconjuntos de gonadotropos que almacenan y producen LH o FSH (gonadotropos monohormonal y gonadotropos bihormonal), esta heterogenicidad en el patrón de almacenamiento de LH y FSH dentro de la población gonadotropos se considera la base morfológica para que la secreción de LH y FSH sea diferente (Ginther, et al., 2009; Ginther 2008).

2.2.1. Hormonas gonadotrópicas

La FSH y LH son polipéptidos glicoprotéicos con una subunidad glicoprotéica común " α ", con la cual forman heterodímeros no covalentes con la subunidad " β " la cual es hormona-específica (FSH β and LH β) (Weltzien et al., 2014).

La LH y FSH son producidas en los gonadotropos de la hipófisis y juegan un papel importante en el control endócrino de la reproducción, constituyendo el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (HHG). La GnRH estimula la síntesis y liberación de FSH y LH, y éstas uniéndose a receptores específicos en las gónadas estimulan la esteroidogénesis y gametogénesis. Adicionalmente a la acción de la GnRH, la FSH y LH se regula por mecanismos de retroalimentación y de factores inhibitorios cerebrales (kisspeptina, neuropéptido Y, dopamina, hormona inhibidora de liberación de gonadotropinas y por señalización parácrina por parte de la hipófisis con el sistema activina/inhibina/folistatina) (Weltzien et al., 2014).

La respuesta folicular a FSH y LH está regulada por el desarrollo de los mismos, la FSH participa con un papel importante en el reclutamiento, selección y dominancia, mientras que la LH contribuye en la dominancia, maduración final y ovulación (Balasch & Fábregues, 2006).

2.2.1.1. Hormona Folículo Estimulante

La Hormona Folículo Estimulante (FSH) es una de las hormonas glicoprotéicas producidas en la hipófisis al igual que la Hormona Luteinizante (LH). Al ser una molécula hidrofílica, la FSH se une y activa receptores de membrana pertenecientes a la superfamilia GPC-R, el receptor de FSH muestra gran afinidad por esta y se localiza en las células de Sertoli del testículo las células de la granulosa del folículo ovárico. La FSH promueve el crecimiento y maduración de los folículos ováricos así como de la espermatogénesis (Landomiel et al., 2014).

2.2.1.2. Hormona Luteinizante

La hormona luteinizante participa en la regulación ovárica y testicular, representa un rol crítico en la maduración folicular, ovulación, desarrollo y mantenimiento del cuerpo lúteo e interviene en la síntesis de esteroides sexuales, factores de crecimiento y citocinas (Perera-Marín, et al., 2007).

Los folículos ováricos tienen requerimientos particulares con la LH relacionados con su desarrollo, la cantidad de esta hormona necesaria no está establecida aún, sin embargo hay evidencia de que con el 1% de los receptores ocupados basta para que se exprese todo su potencial esteroidogénico, por lo tanto concentraciones basales de LH bastarán para estimular a las células de la teca, no obstante, exceso en el estímulo de LH afectarán negativamente el desarrollo normal del folículo preovulatorio (Balasch & Fábregues, 2006).

El incremento de LH que precede a la desviación del folículo tiene un efecto positivo en la producción de inhibina y estradiol del folículo dominante durante la desviación, el aumento posterior de LH es presumible a la disminución de progesterona y el aumento de GnRH (Roser & Meyers-Brown, 2012).

3. Foliculogénesis

El ovario de los mamíferos es el sitio donde los gametos femeninos se desarrollan y maduran en un ambiente propicio para ellos (J. R. V. Silva, et al., 2009). Durante el desarrollo embrio/fetal, las células germinales primordiales migran a la cresta gonadal donde proliferan y posteriormente entran en división meiótica donde se quedan en arresto como ovocito primario en profase I. Este arresto continúa hasta la atresia o hasta que el ovocito es estimulado por un aumento de LH durante la vida posnatal (Donadeu & Pedersen, 2008). La formación de folículos marca el inicio de la foliculogénesis, que se puede definir como el proceso mediante el cual un folículo primordial, que consiste en una célula germinal y una capa plana de células de la granulosa, crece y se diferencia a un folículo preovulatorio; el cual madura y ovula gracias a estímulos hormonales (Gigli I, 2006). Este folículo contiene un ovocito maduro, células de la granulosa que rodean al antro y que a su vez se encuentran rodeadas por células de la teca (J. R. V. Silva et al., 2009).

Una vez formados, los folículos primordiales representan el pool entero de células disponibles en la vida reproductiva de la hembra (Epifano & Dean, 2002; Palermo, 2007). En la yegua este pool es de aproximadamente 40,000 folículos primordiales y aproximadamente 100 en alguna fase de crecimiento (Raz & Aharonson-Raz, 2012).

La etapa inicial de la foliculogénesis es independiente de gonadotropinas hipofisarias e involucra factores parácrinos intraováricos, este se puede dividir en tres fases de desarrollo.-

- 1.- Crecimiento del Folículo Preantral: Abarca la transición de folículo primordial a folículo primario y la formación y crecimiento de folículos secundarios.
- 2.- Crecimiento del Folículo Antral: Formación del antro y desarrollo de los folículos antrales (dependientes de gonadotropinas).

3.- Crecimiento terminal del folículo antral: Desarrollo del folículo antral a preovulatorio (J. R. V. Silva et al., 2009).

La maduración histológica del folículo preovulatorio equino se caracteriza por una extensa expansión de las células de la granulosa, el proceso ovulatorio del folículo, implica un patrón específico y único de regulación de genes en células de la teca y la granulosa (Ginther, et al., 2008).

3.1. Mecanismo de ovulación

El mecanismo de ovulación involucra la ablación de un folículo preovulatorio y la subsecuente expulsión del líquido folicular y liberación del ovocito. La oleada preovulatoria de LH inicia la ovulación activando una serie de eventos que involucran varias hormonas y enzimas. Las prostaglandinas juegan un papel crucial en el proceso de ruptura folicular (Figura 6). En el folículo las prostaglandinas se producen por prostaglandina G/H sintetasa (PGHS-2) la cual es estimulada por la oleada preovulatoria de LH en las células de la granulosa (Cuervo-Arango & Domingo-Ortiz, 2011).

Antes de la ovulación, la oleada de LH inicia una cascada de eventos que permiten la degradación de la matriz extracelular y la ruptura de la pared folicular, las prostaglandinas juegan un rol importante en el proceso de ovulación, la ciclooxigenasa 2 (COX-2) es la enzima involucrada en la producción de prostaglandinas en el folículo (Cuervo-Arango, et al., 2011).

Durante la ovulación, el ovocito y corona radiata entran en el oviducto, mientras que la mayor parte del líquido folicular pasa a la cavidad peritoneal, las hormonas de este fluido se absorben rápidamente en la circulación que conduce a un aumento pronunciado en concentraciones de inhibina en el día de la ovulación (Ginther et al., 2008).

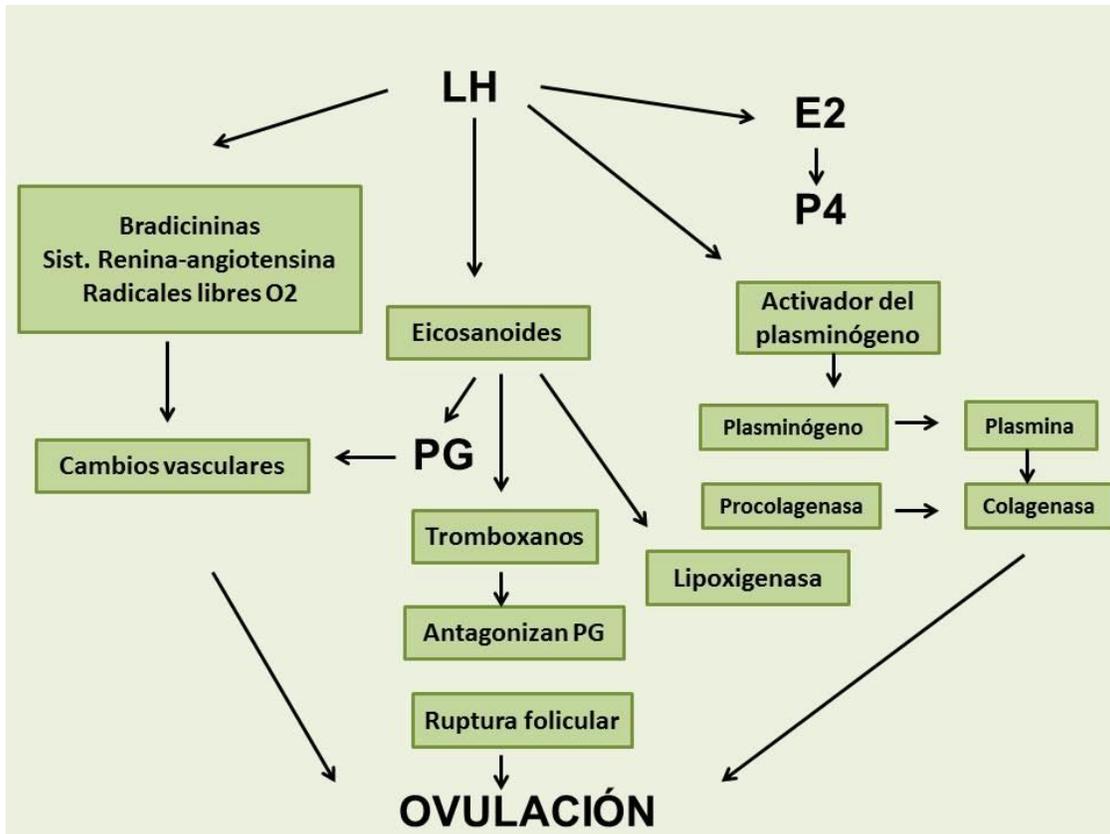


Figura 6. Esquema de los mecanismos propuestos durante la ovulación. Modificado de Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos, Gigli I, Russo A, Agüero A.; In vet, 2006.

3.2. Manipulación farmacológica de la ovulación

Muchos métodos se han utilizado con la finalidad de controlar el momento de la ovulación en las yeguas, sin embargo la sincronización no es igual de efectiva como en otras especies debido a la variabilidad en la duración de la fase folicular y al crecimiento individual de los folículos. Actualmente para inducir la ovulación hay tratamientos que usan inyecciones de hCG a pesar de la respuesta inmunológica que produce esta molécula (Briant et al., 2003). La optimización de los tratamientos para inducir la ovulación en yeguas está indicada en animales con alto valor económico que se encuentren en época

reproductiva con la finalidad de reducir las dificultades que la reproducción natural conlleva (Briant, et al., 2004).

En yeguas, los tratamientos con gonadotropina coriónica (1500-3000 UI) humana (Briant et al., 2004) resultan en el decremento inmediato en los niveles de estradiol y permitiendo el incremento rápido de LH 24 horas después de su aplicación. La expresión de PGHS-2 en las células de la granulosa ocurre alrededor de 30 horas después de la aplicación de hCG, así que la ovulación ocurre entre 36 y 42 horas posterior a la aplicación (Cuervo-Arango et al., 2011). El incremento en los niveles de LH en las ovulaciones inducidas con hCG son similares a los que se documentan con ovulaciones espontáneas (Checura et al., 2009).

4. Dinámica Folicular

Como se ha mencionado en la literatura, la yegua es una especie monovular, significando que un folículo es el que se desarrolla hasta convertirse en dominante y varios folículos subordinados regresan/atresian durante la primera oleada folicular. La emergencia de las oleadas foliculares, así como la selección y dominancia de un folículo se encuentran reguladas por la interacción de mecanismos sistémicos y locales que involucran cambios en la circulación de gonadotropinas y factores foliculares locales (parácrinos y autócrinos) (Ginther, et al., 2009; Roser & Meyers-Brown, 2012)

En comparación con otras especies de animales domésticos, el ovario de la yegua tiene una estructura única, caracterizado por poseer un tamaño grande (40-80 g de peso), la presencia de una fosa de la ovulación y una ubicación invertida de su corteza y médula; como característica de especie, En la yegua se desarrollan de una o dos oleadas foliculares distintas durante un ciclo estral (Ginther, et al., 2007; Ginther 2008).

La aparición de cada onda folicular está temporalmente asociada con un aumento de FSH la cual permite que una serie de 7 – 11 folículos se recluten al inicio de cada oleada (Figura 7). A partir de la desviación, el folículo preovulatorio éste crece a una tasa promedio de 3 mm por día hasta alcanzar un diámetro de aproximadamente 35 mm continuando así hasta 2 días antes de la ovulación, sin embargo, los folículos equinos pueden crecer hasta un tamaño preovulatorio de más de 55 mm (Ginther, 2009; Gastal, et al., 2009; Squires 2007, Ginther 2008).

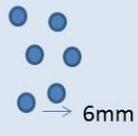
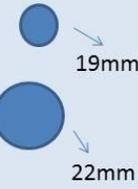
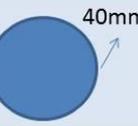
Etapa	Proceso en curso	Hormonas	Día	Folículos
Desarrollo de la oleada folicular	Emergencia	FSH ↑	7	 6mm
	Crecimiento			
Desviación folicular	Continúa crecimiento	FSH ↓	13	 19mm 22mm
	Activación de mecanismos de desviación	17β estradiol ↑ Inhibina ↑		
Inicio de la fase preovulatoria	Continúa crecimiento	LH ↑ 17β estradiol ↑	17	 35mm
Fase preovulatoria	Cese del crecimiento	LH →	19	 40mm
	Maduración (patrón aracterístico de expresión de factores)	17β estradiol ↑		
Células de la granulosa-luteinización Vascularización	ovulación	LH ↑ Progesterona ↑	21	

Figura 7. Desarrollo folicular durante el ciclo estral de la yegua. Etapas, procesos y hormonas predominantes en circulación periférica. Modificado de Reproductive cycles of horses, Aurich, Christine, Animal Reproduction Science, 2011.

4.1. Oleadas Foliculares

Las oleadas foliculares comienzan durante la pubertad entre los 11 y 15 meses en la yegua y en el ciclo estral se catalogan como primarias y secundarias. La oleada primaria emerge en el diestro, cuando el folículo dominante pasa a ser preovulatorio, resultando así la ovulación en el estro. La oleada secundaria emerge al final del estro o en el diestro temprano donde puede no ovular y regresar u ovulando a la mitad del diestro (Roser & Meyers-Brown, 2012).

4.1.1. Emergencia, Selección y Dominancia Folicular

La emergencia de la oleada folicular se identifica cuando el mayor de los folículos alcanza 6mm de diámetro, el número promedio de folículos que emergen va de 7-11, entrando a una fase común de crecimiento de 3mm por día. Esta fase dura aproximadamente 5-6 días y finaliza con el desarrollo de los dos folículos con mayor tamaño listos para la desviación, siendo un evento abrupto reconocible por el decremento en la tasa de crecimiento del segundo folículo de mayor tamaño (Roser & Meyers-Brown, 2012).

Cuando el folículo de mayor tamaño alcanza los 13mm y es dependiente de FSH para su crecimiento, los niveles de ésta se encuentran en su máxima concentración, posteriormente los niveles de FSH disminuyen, habiendo un intervalo entre el pico y la desviación de 3 días aproximadamente. A pesar de que los folículos aún son dependientes de FSH para su crecimiento, la secreción folicular de estrógenos e inhibina contribuyen al descenso en los niveles de FSH (Raz & Aharonson-Raz, 2012). La desviación se completa cuando los folículos alcanzan un promedio entre 19 y 22.5 mm de diámetro (Roser & Meyers-Brown, 2012).

La fase de dominancia es definida como el periodo que abarca desde el inicio de la desviación hasta el comienzo de la fase preovulatoria, el folículo

preovulatorio mantiene un crecimiento constante de 3mm por día (Roser & Meyers-Brown, 2012).

4.2. Atresia folicular

En yeguas y otras especies domésticas el crecimiento folicular y la atresia se asocian a cambios en los factores de crecimiento a nivel ovárico (Spicer, et al., 2005).

La atresia es un proceso degenerativo controlado hormonalmente mediante el cual los folículos pierden su integridad y está encaminado al mantenimiento de la homeostasis tisular (Santos et al., 2008). Esta puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo folicular (González-Valle, Batista-Arteaga, & Gracia-Molina, 1998). La atresia del folículo dominante da la oportunidad a otros de continuar con su crecimiento, ya que los efectos supresores del folículo dominante (estradiol-inhibina) se alteran lo suficiente como para permitir el crecimiento de otros folículos (Dippert, Ray, & Squires, 1995).

El folículo dominante al tener requerimientos hormonales específicos, es susceptible a cualquier anomalía en el estímulo, afectándolo y predisponiéndolo a atresia o luteinización temprana. Cada folículo tiene un umbral a partir del cual debe ser estimulado por las hormonas correspondientes para su desarrollo normal (Balasch & Fábregues, 2006).

4.3. Folículos Anovulatorios Hemorrágicos (FAH's)

La falla en la ovulación del folículo dominante y la persistencia de la estructura anovulatoria, se ha reportado en algunos animales domésticos y en las mujeres. Dicho evento se ha reportado como "natural", sin embargo en especies domésticas como la vaca y la yegua en quienes la dinámica folicular es rutinariamente seguida mediante ultrasonografía han permitido las observaciones necesarias para caracterizar este síndrome (Cuervo-Arango & Domingo-Ortiz, 2011).

La anovulación en yeguas evidencia la hemorragia del folículo dominante con la subsecuente organización del contenido folicular y en la mayoría de las veces la luteinización de la pared folicular sin el colapso previo del folículo (Cuervo-Arango & Domingo-Ortiz, 2011 Cuervo-Arango, 2013). Ginther et al. (2007) lo define como la formación de un hematoma en el antro folicular en lugar de la ovulación; siendo el punto focal de esta condición la falla en el colapso del folículo dominante imposibilitando la ovulación y por consiguiente la fertilización (Ginther, et al., 2007).

La incidencia de los FAH's es baja (5-20%), sin embargo puede resultar frustrante enfrentarse a esta condición (Cuervo-Arango & Newcombe, 2010). Los mecanismos bajo los cuales se desarrollan los FAH's en la yegua permanecen poco claros, se ha propuesto que la incidencia es mayor durante la transición de otoño y con yeguas mayores a 20 años (Ginther et al., 2007). A fin de entender mejor este fenómeno en las especies equinas se han realizado estudios de los factores de riesgo que predisponen al desarrollo de FAH's, como yeguas con ovulaciones múltiples, época del año y el uso de tratamientos de inducción a la ciclicidad (Cuervo-Arango & Domingo-Ortiz).

5. Gestación Temprana en la yegua

El embrión equino entra al útero hasta el día 6-6.5 después de la ovulación (Allen & Wilsher, 2009; Keith J. Betteridge, 2000; K. J. Betteridge, 2007) por la papila útero-tubárica, la cual se relaja por acción de $\text{PGF2}\alpha$. Una vez ocurrido esto se mueve de 10 a 20 veces al día por todo el útero, impulsado por contracciones del miometrio estimuladas por la liberación de $\text{PGF2}\alpha$ y PGE2 por parte del embrión, a este movimiento se le conoce como migración. Poco después de haber entrado al útero, las células del trofoblasto secretan grandes cantidades de glicoproteínas (Klein & Troedsson, 2012) ricas en treonina y serina, las cuales son atrapadas por la zona pelúcida, moldeándose en una cubierta que envuelve al embrión durante los siguientes 20-25 días (Kingma et al., 2011). El desarrollo de esta "cápsula equina" no es al azar y cumple con diversas funciones que incluyen soporte, previniendo la elongación del trofoblasto y confiriéndole al embrión su característica estructura esférica permitiéndole moverse dentro del útero con cierta facilidad, además de confiere al embrión resistencia, contra de las fuerzas miométriales que resultan de su migración dentro del útero y nutrición, ya que asiste en la acumulación y recolección del histótrofo rico en uterocalina y uteroglobulina que son su principal fuente de nutrientes durante los primeros 40 días (Allen & Wilsher, 2009; Keith J. Betteridge, 2000).

La migración del embrión dentro del útero permite la regulación a la baja de los receptores de oxitocina en el endometrio previniendo la liberación de $\text{PGF2}\alpha$ a fin de evitar la luteólisis del cuerpo lúteo primario y mantener así la gestación, continuando hasta los días 16-17 cuando se queda fija usualmente en la base de alguno de los cuernos (Allen & Wilsher, 2009; Keith J. Betteridge, 2000).

La cápsula equina permanece intacta al día 20, pero en los próximos 10-15 días desaparece por la acción de enzimas secretadas por las capas maternas y fetales e involucrando neutrófilos y macrófagos para deshacerse de los remanentes celulares (Klein & Troedsson, 2012). En este momento se expone el alantocorion con el ambiente uterino, la vesícula embrionaria rota y se orienta probablemente por la diferencia de espesor entre la porción bi y trilaminar de la vesícula, ubicándose el embrión en la parte antimesometrial del cuerno uterino (Allen & Wilsher, 2009).

La yegua posee una placentación denominada como epiteliocorial que representa la menos invasiva de todas las formas de placentación, no obstante una subpoblación de células cuyo origen es el trofoblasto del embrión se diferencia entre los días 25 -35 formando una banda de tejido avascular llamado cinturón coriónico que rodea al concepto por el ecuador, al día 35-36 aproximadamente. Estas células invaden el epitelio uterino (Lunn, et al., 1997) formando las copas endometriales que son estructuras altamente especializadas, que producen gonadotropina coriónica equina (eGC). Esta hormona se puede detectar en la circulación materna alrededor del día 40 de gestación y tiene actividad luteogénica y luteotrópica. El nivel máximo de secreción de eCG se encuentra entre los días 60 y 70 y las copas endometriales normalmente están atrofiadas aproximadamente al día 100-120 (de Mestre et al., 2008).

Alrededor del día 40 el tono uterino disminuye y el concepto comienza a perder su forma esférica, el alantoides continúa con su expansión y el ahora vestigio del saco vitelino se encuentra rodeado por el alantoides incorporándose a la base del cordón umbilical. Entre los días 55-60 el concepto ocupa todo el cuerno uterino y todo el útero alrededor de los días 80-85. En esta etapa el alantocorion tiene una apariencia rojiza debido al desarrollo microcotiledones altamente vascularizados y el feto tiene ya la apariencia completa de un equino (Allen & Wilsher, 2009).

5.1. Reconocimiento materno de la gestación

Al inicio de la gestación la gran afinidad de la LH por sus receptores (Balasch & Fábregues, 2006) en las células del cuerpo lúteo primario, permite que éste se mantenga viable a pesar de las bajas concentraciones de LH circulantes en esta etapa. La P4 producida por el CL primario disminuye gradualmente entre los días 12 y 30 postovulación, recuperándose significativamente a partir del día 35 gracias a la acción luteogénica y luteotrópica de la eCG, promueve ovulaciones secundarias y luteinización de folículos que mantendrán el aporte de P4 hasta el día 180 de la gestación (Castro et al., 2015 ; Conley, 2016).

5.2. Gonadotropina coriónica equina

La Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) es una hormona glicoprotéica heterodimérica constituida por dos cadenas polipeptídicas (subunidades α y β) unidas de manera no covalente de una vida media larga producida por las copas endometriales de las yeguas gestantes (Ferreira et al., 2013); dependiendo de la especie tiene actividad similar a la FSH y LH por poseer la habilidad de unirse a los receptores de ambas localizados en las células de la granulosa y la teca (Pessoa et al., 2016).

La gonadotropina coriónica equina se identificó por primera vez hace más de 80 años en el suero de yeguas gestantes y se reportó que es producida por las copas endometriales provenientes de células del trofoblasto altamente específicas (Allen, 1984; M. Boeta, et al., 2006).

En el ovario de yeguas gestantes la eCG actúa en el receptor LH/CG induciendo la formación de cuerpos lúteos secundarios y proveyendo aporte luteotrópico para la función de todos estos, sin embargo existe poca afinidad de la eCG por los receptores de LH (2-3%) siendo sin embargo las concentraciones circulantes de esta hormona mucho mayores que las de LH (Myriam Boeta & Zarco, 2005).

In *vivo* la producción de eCG dura en promedio 80 días, siendo importante recordar que el genotipo del feto influye profundamente en la producción de eCG (Calderon López et al., 2012).

La secuencia de aminoácidos de la eCG y la LH es idéntica y por lo tanto ambas tienen la capacidad de unirse al mismo receptor (LH/ eCG-R), sin embargo la afinidad de la eCG es mucho más baja por poseer diferentes sitios de glicosilación (M. Boeta et al., 2006).

5.2.1. Reacción de las copas endometriales

La formación exitosa de las copas endometriales se basa en tres eventos clave: La proliferación rápida de las células del cinturón coriónico, su diferenciación final a células binucleadas y la migración de estas al endometrio (Castro et al., 2015; de Mestre et al., 2008).

Las células de cinturón coriónico comienzan a proliferar alrededor del día 30 de la gestación y las células binucleadas, completamente especializadas expresan eCG alrededor del día 32, formando así las copas endometriales e incrementando en número al día 35 (Castro et al., 2015; de Mestre et al., 2008).

Las células binucleadas, altamente especializadas expresan el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo 1 (MHC-I) y alrededor del día 45 comienzan a provocar una fuerte respuesta inmune por parte de la madre (Castro et al., 2015; de Mestre et al., 2008).

La completa regresión de las copas endometriales se considera cuando la eCG disminuye a niveles no detectables (M. Boeta et al., 2006).

5.3. Cuerpo Lúteo en la Gestación

Un Cuerpo Lúteo primario resulta del proceso de ovulación de un folículo dominante de la oleada folicular primaria cerca del final del estro cuando hay prevalencia de estrógenos. El cuerpo lúteo secundario resulta de la ovulación de un folículo dominante en el diestro o en la gestación cuando hay prevalencia de progesterona (Bergfelt, et al., 1989).

Por otra parte, los cuerpos lúteos accesorios resultan de la luteinización de folículos anovulatorios durante la gestación temprana, ambos, secundario y accesorios se refieren como cuerpos lúteos suplementarios (Bergfelt et al., 1989). Una glándula lútea no funcional y afectada por el proceso de regresión, cual quiera que fuese su origen, se denomina cuerpo albicans. (Bergfelt & Adams, 2007).

5.3.1. Resurgencia del cuerpo lúteo primario

El cuerpo lúteo tiene el potencial hormonal de secretar progesterona desempeñando un papel fundamental en la biología de la reproducción animal. En equinos la resurgencia del CL primario en la gestación se documenta al principio de la gestación, alrededor del día 35 y la secreción de P4 del CL va de la mano con el aumento del tamaño, vascularidad y la formación del coágulo (cuerpo hemorrágico). Después de su etapa de desarrollo, en los próximos días el CL se caracterizan por una meseta en la producción de P4 seguido por una disminución gradual alrededor de 15 días. La P4 disminuye alrededor de 40 % entre el día 8 y el 15, y en ausencia de luteólisis la concentración de P4 al final de la disminución gradual en el día 15 se mantiene hasta el comienzo del resurgimiento del CL (Castro et al., 2015).

6. Efectos de la gestación en la dinámica folicular

Basado en datos ultrasonográficos y de palpación rectal, la dinámica folicular en la primera mitad de la gestación es similar a lo que ocurre en la primera fase de la época anovulatoria, con un periodo inicial de actividad variable (entre los días 11 y 40) caracterizado por el desarrollo esporádico de oleadas "mayores" y oleadas "menores" con mayor frecuencia; seguido por un decremento en la actividad folicular entre los días 50 y 140 de gestación y por lo general no evidenciando folículos mayores de 15 mm (Donadeu & Pedersen, 2008).

Hay evidencia de niveles bajos de FSH, sin embargo no hay alguna que sugiera que es responsable de la reducción del crecimiento folicular entre los días 11 y 40. Este efecto quizás podría deberse a la reducción de los niveles de LH (retroalimentación negativa con progesterona) similar a los efectos estacionales que producen la reducción de la LH circulante en el crecimiento de los folículos en la época de transición (Donadeu & Pedersen, 2008).

MATERIAL Y MÉTODOS

MODELO CONCEPTUAL

En las yeguas se presenta una alteración en la actividad ovulatoria que involucra hemorragia dentro del antro de un folículo preovulatorio y luteinización de la pared sin su previa ruptura. Dicha alteración es una condición anovulatoria normal que ocurre en yeguas con gestaciones tempranas a pesar de las altas concentraciones de eCG y niveles basales de LH; la secreción de FSH sigue contribuyendo al desarrollo folicular debido a que su patrón de secreción continúa.

Debido a las diferencias en la dependencia de la secreción de GnRH, la administración de un antagonista de GnRH podrá inhibir en su totalidad la secreción de LH y parcialmente la de FSH, alterando la dinámica folicular en la yegua gestante. Bajo esta premisa, se pretende realizar un análisis de la dinámica folicular bajo el tratamiento con el antagonista de GnRH y que con la administración de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) a uno de los tratamientos como inductor de la ovulación se pretende que este proceso se desencadene (Figura 8).

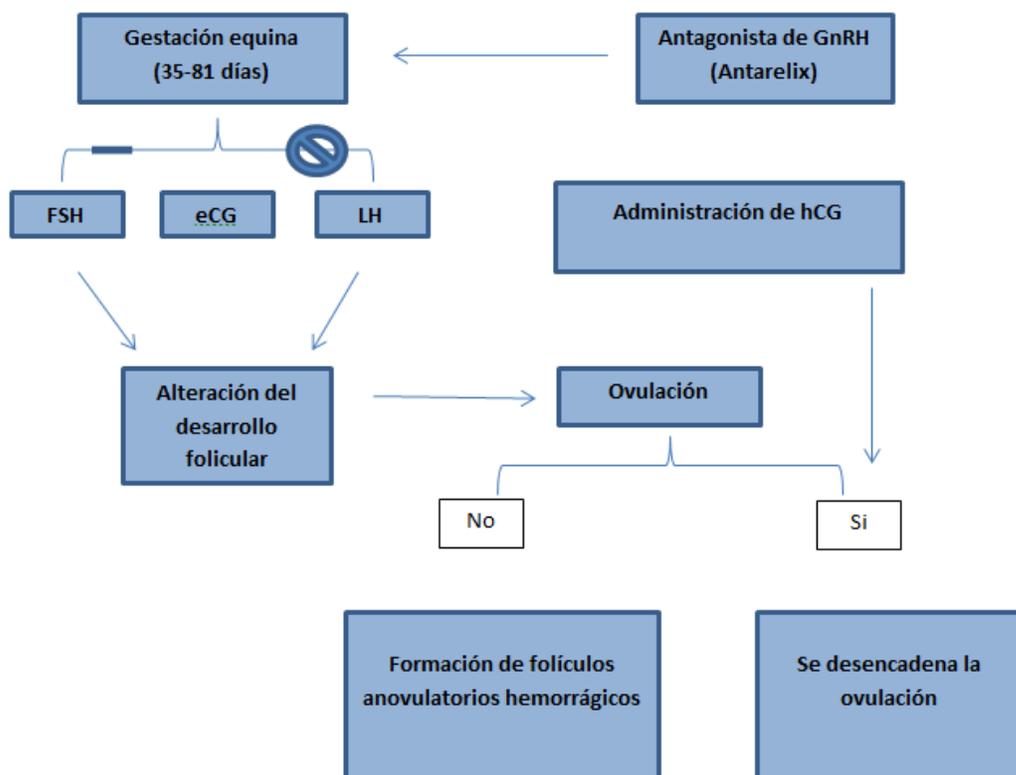


Figura 8. Modelo conceptual de EFECTO DE UN ANTAGONISTA DE GnRH SOBRE LA DINÁMICA FOLICULAR Y LOS NIVELES SÉRICOS DE FSH EN YEGUAS CON GESTACIÓN EQUINA.

LOCALIZACIÓN

El presente estudio se realizó en el antiguo Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agrícola y Ganadera (CEIEPAG) de la FMVZ, ubicado en el kilómetro 2.5 de la carretera Chalco-Mixquic, Chalco, Estado de México (Figura 9).

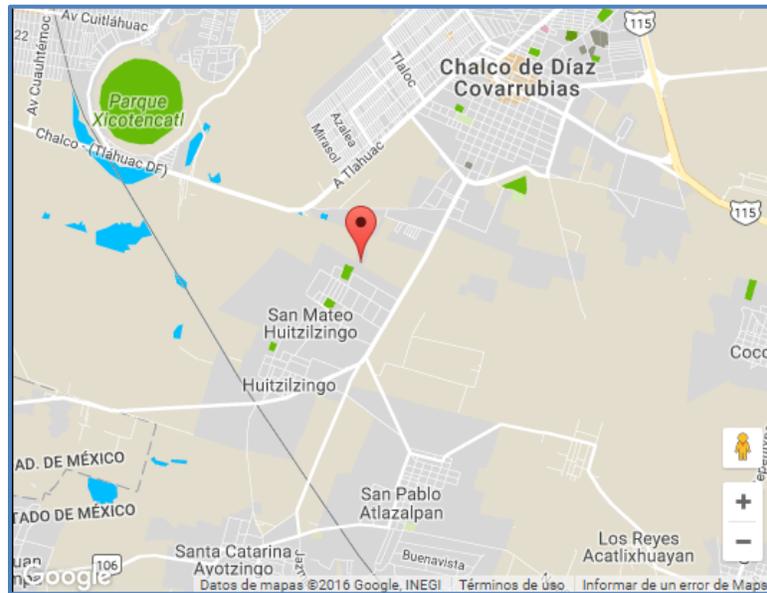


Figura 9. Localización del antiguo Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agrícola y Ganadera (CEIEPAG) de la FMVZ, kilómetro 2.5 de la carretera Chalco-Mixquic, Chalco, Estado de México, Datos de mapas INEGI 2016.

POBLACIÓN

Se utilizaron 14 yeguas clínicamente sanas, con gestación de 35 días, con historial de 1-3 partos, un rango de edad entre 5-10 años y condición corporal entre 2.5-3.5 en escala de Martin-Rosset (Bergfelt & Ginther). La alimentación de las yeguas fue a base de heno de avena y heno de alfalfa.

Como semental se empleó un caballo criollo de 10 años, clínicamente sano. Para realizar el servicio lo más próximo a la ovulación, las yeguas fueron receladas diariamente, las que mostraron interés en el semental fueron monitoreadas diariamente mediante palpación y ultrasonografía para evaluar el desarrollo folicular y programar el servicio. Éste se llevó a cabo mediante inseminación artificial. Para la colección de semen se empleó una vagina artificial tipo Colorado y se realizó la inseminación transcervical con semen fresco sin diluir; el diagnóstico de gestación se realizó en el día 15 post-ovulación, en caso de que éste fuese negativo se volvió a inseminar a las yeguas que lo requerían.

ULTRASONOGRAFÍA

A partir del diagnóstico de gestación, se monitoreó la viabilidad embrionaria cada tercer día (Bergfelt & Ginther, 1986). La viabilidad fetal se confirmó mediante la detección del latido cardiaco y movimiento fetal.

Desde los primeros 30 días de gestación se llevó a cabo el seguimiento ultrasonográfico de crecimiento folicular dos veces por semana hasta que el diámetro folicular alcanzó 30 mm de diámetro, a partir de ese momento el seguimiento se realizó diariamente.

TRATAMIENTO

A partir del día 35 de gestación, las 14 yeguas fueron divididas al azar en tres grupos: Grupo control, Grupo anti-GnRH y Grupo anti-GnRH+hCG.

El antagonista de GnRH utilizado fue Antarelix (D-Nal, D-Phe, D-Pal, 4, Phe, D-Hcit, 7, Lys (iPr), 9, D-Ala) a una dosis de 0.01 mg/kg IV diariamente por 7 días, posteriormente se aplicó semanalmente, vía subcutánea, a una dosis de 0.07 mg/kg durante 5 semanas en total (Costilla-Arias, 2011), a partir del día 35 de gestación. En el grupo de anti GnRH + hCG, se monitoreó a la yegua por ultrasonografía y al momento de detectar un folículo de 35 mm de diámetro, 24 horas después, se administró hCG a dosis de 1500 UI IV.

La aplicación de hCG fue para inducir la ovulación y ver su impacto en el desarrollo de los folículos anovulatorios hemorrágicos.

Se midieron los niveles séricos de FSH para observar la relación con la administración del antagonista de GnRH.

DETERMINACIÓN DE FSH EN SUERO

Se determinaron las concentraciones séricas de FSH entre los días 35 y 81 de gestación. Para ello, a partir de la quinta semana de gestación se obtuvieron dos veces por semana muestras sanguíneas en tubos sin anticoagulante de cada yegua mediante punción yugular. Una vez retraído el coágulo, las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 10 minutos dentro de la primera hora posterior a su obtención para separar el suero, el cual se mantuvo en congelación a -20°C hasta la determinación hormonal por enzimoimmunoensayo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se ordenaron y concentraron en tablas de Excel para su posterior análisis con el programa estadístico IBM SPSS Statistics 21® mediante un Análisis de Varianza para mediciones repetidas.

RESULTADOS

Por la presentación de los resultados se optó por dividir en subgrupos, siendo esto como a continuación se muestra (Cuadro 1):

Antagonista GnRH	Anti GnRH_a n=4	Yeguas a las que se les administró el Antagonista de GnRH de acuerdo al protocolo y sí tuvieron desarrollo folicular evidente
	Anti GnRH_b n=4	Yeguas a las que se les administró el Antagonista de GnRH de acuerdo al protocolo y no tuvieron desarrollo folicular evidente
Antagonista GnRH+hCG	Anti GnRH+hCG n=3	Yeguas a las que se les administró el Antagonista de GnRH de acuerdo al protocolo y al detectar un folículo $\geq 35\text{mm}$ se les administró hCG de acuerdo al protocolo
Control	Control n=3	Yeguas a las que no se les administró el antagonista de GnRH

Cuadro 1. Redistribución de los tratamientos en subgrupos de acuerdo a la presentación de los resultados.

1. Alteración de la dinámica folicular

Ninguna de las yeguas sometidas al experimento reporta haber perdido la gestación dentro del periodo de estudio; no obstante la dinámica folicular se vio alterada a consecuencia de la administración del antagonista de GnRH de acuerdo al protocolo, misma que a continuación se describe.

Terminología (Cuadro 2):

Folículos $\leq 19\text{mm}$.- Se asume que para llegar a este tamaño se encontraron bajo la influencia de FSH, considerándose como límite inferior para el inicio de la desviación folicular

Folículos $\geq 20\text{mm}$.- se consideran folículos participantes en el proceso de desviación folicular, teniendo la capacidad de convertirse en un folículo dominante

Folículos de $\geq 35\text{mm}$.- Folículos los que no se desencadena el proceso de ovulación, sino que hay la formación de un hematoma en el antro folicular en su lugar y se denominan Folículos Anovulatorios Hemorrágicos (FAH).

Folículos atrésicos.- Folículos que pierden su integridad morfológica y funcional, puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo folicular.

CL Primario.- Resultado de una ovulación simple o doble en la fase folicular del ciclo estral. De este se expulsa el ovocito que tras el servicio da origen a la gestación (dominancia de estrógenos).

CL Secundarios.- Resultado de las ovulaciones (>2 días de la ovulación primaria) durante el diestro o gestación temprana (dominancia de progesterona).

CL Accesorios.- Resultado de la luteinización de folículos anovulatorios durante el diestro y la gestación temprana (dominancia de progesterona).

Folículos Atresiaados.- Folículos en cualquier estadio del desarrollo que sufrieron regresión.

Cuadro 2. Luteal Gland Terminology Used During the Estrous Cycle and Pregnancy in the Mare;

Modificado de ANATOMY AND PHYSIOLOGY OF THE MARE, Bergfelt 2009.

Subgrupo 1 Anti GnRH α

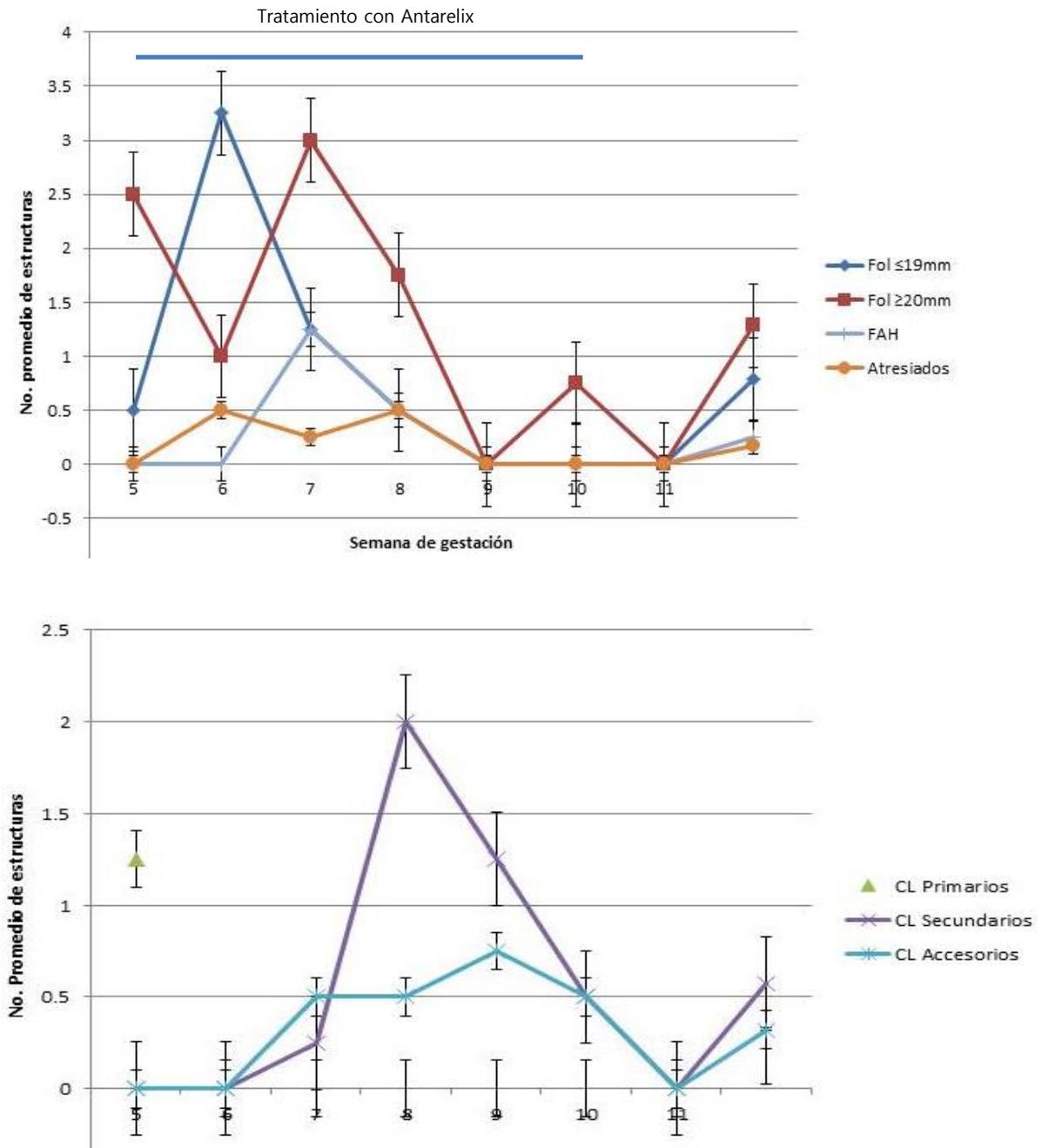


Figura 10. Resumen de la dinámica folicular y estructuras lúteas del subgrupo Anti GnRH α

El subgrupo GnRHa dentro de la dinámica folicular evidenció el mayor promedio de folículos $\leq 19\text{mm}$ (figura 10) en la semana 6, correspondiendo a 3.25 estructuras, la media mayor de los folículos $\geq 20\text{mm}$ se halló en la semana 7 correspondiente a los días 49-55 de gestación con 2.5 estructuras, los cuales disminuyeron abruptamente en la semana 9.

Todas las yeguas de este subgrupo iniciaron el tratamiento con al menos un CL Primario, Los CL Secundarios en este subgrupo alcanzaron su punto máximo en la semana 8 con dos estructuras en promedio, cerca del 66% de los folículos $\geq 20\text{mm}$ de la semana 7 continuó su desarrollo y formaron las estructuras lúteas correspondientes.

Por otra parte, se hallaron las medias mayores respecto a las estructuras que sufrieron atresia en las semanas 5 y 8 del estudio siendo este .5. Los CL Accesorios no manifestaron una formación activa, alcanzando un promedio menor a 1 en la semana 9 de gestación.

Subgrupo 2 Anti GnRHb

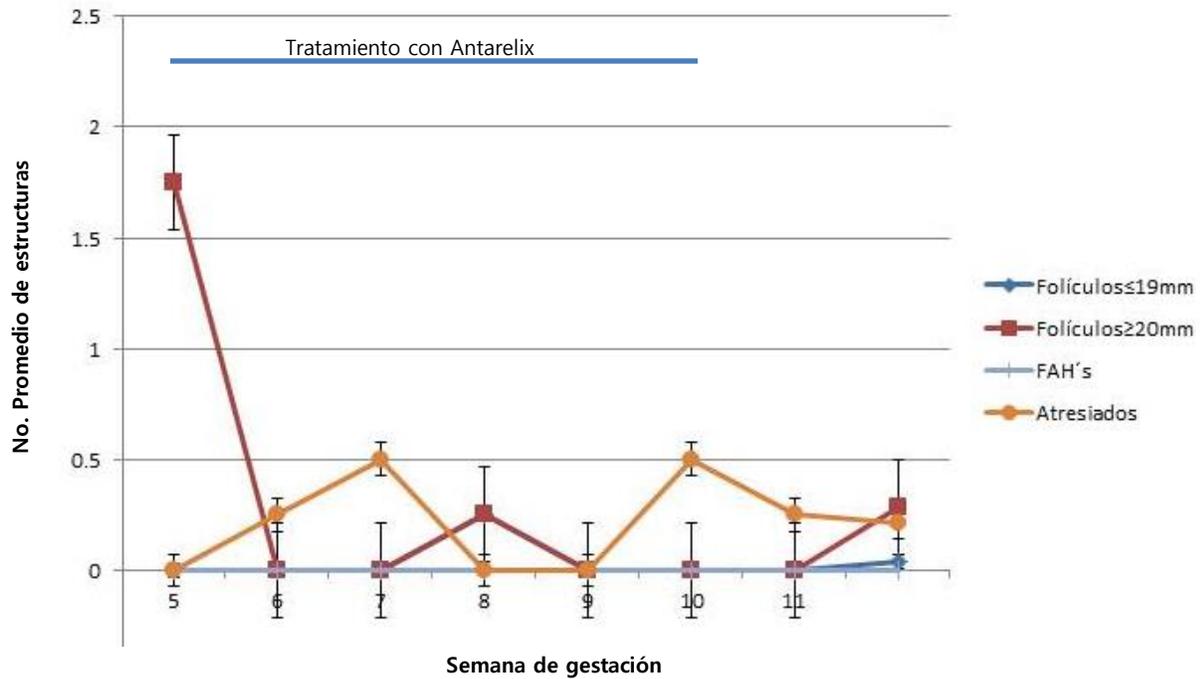


Figura 11. Resumen de la dinámica folicular del subgrupo Anti GnRHb.

El subgrupo GnRHb (Figura 11) no tuvo desarrollo folicular evidente; sin embargo al inicio del tratamiento con el antagonista de GnRH (semana 5) evidenció que todas las yeguas de este subgrupo tenían actividad ovárica notable, un promedio de un CL Primario por cada una, sin embargo en el resto del experimento esta actividad folicular cesó casi por completo.

Subgrupo 3 Anti GnRH+hCG

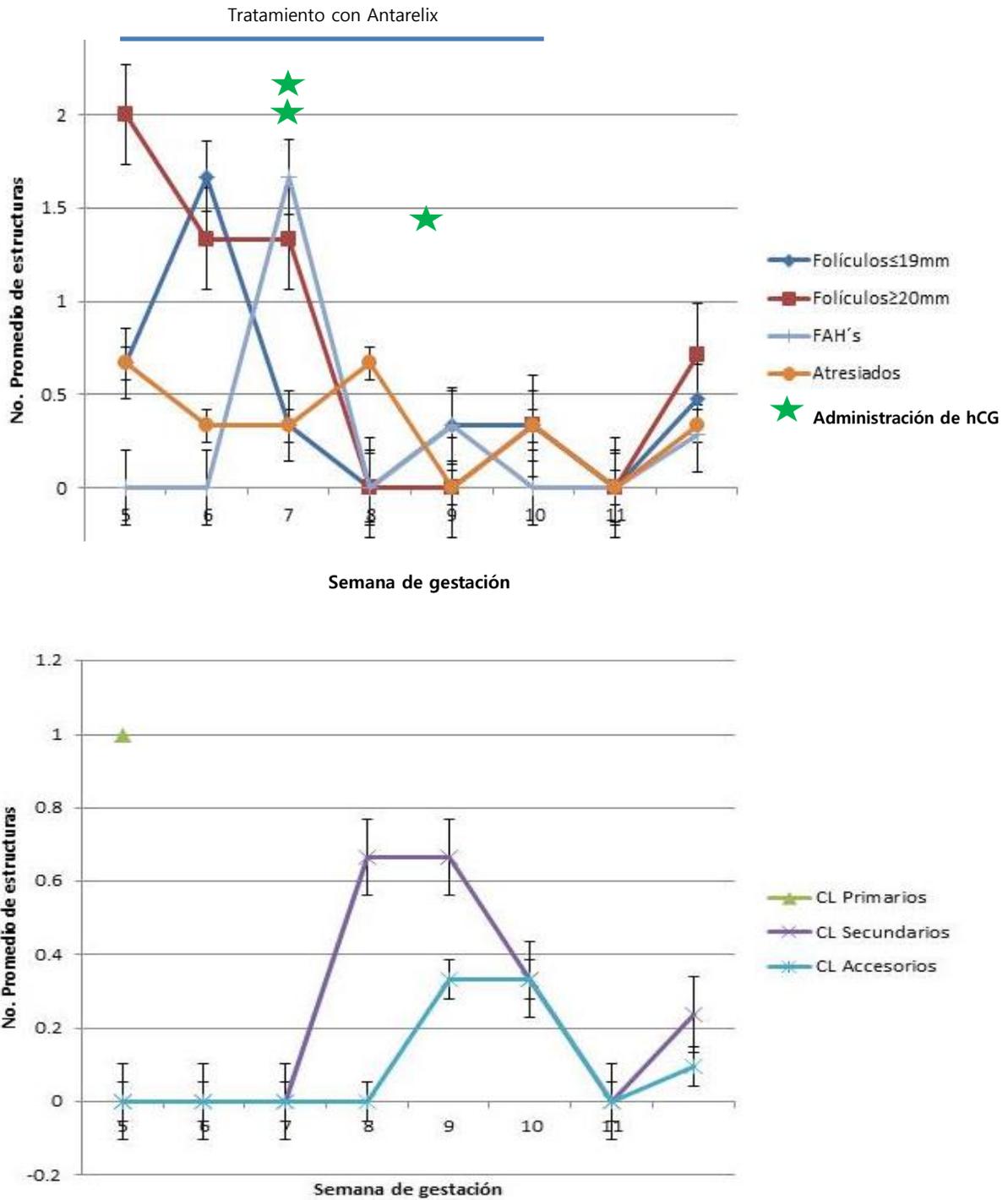


Figura 12. Resumen de la dinámica folicular y estructuras lúteas del subgrupo Anti GnRH+hCG.

El subgrupo GnRH+hCG (figura 12) evidenció su mayor media de folículos $\leq 19\text{mm}$ en la semana 6 siendo esta de 1.6 estructuras, disminuyendo en la semana 7 y no volviendo a desarrollarse en forma significativa, los folículos $\geq 20\text{mm}$ tuvieron su media más alta en la semana 5 correspondiendo ésta a 2, disminuyendo abruptamente para la semana 8, nivel en el que se mantuvieron el resto del estudio.

De acuerdo al protocolo, estas yeguas recibieron una dosis de 2500 UI de hCG al evidenciar un folículo $\geq 35\text{mm}$ a fin de observar si la administración de esta hormona induciría la ovulación del folículo preovulatorio en cuestión. La administración de hCG a dos de las yeguas fue en el día 52 de la gestación y la yegua faltante recibió la administración de esta hormona en el día 62. A pesar de su administración, los folículos $\geq 35\text{mm}$ no ovularon conforme a lo esperado, sino que formaron un folículo anovulatorio hemorrágico.

Grupo 4 Control

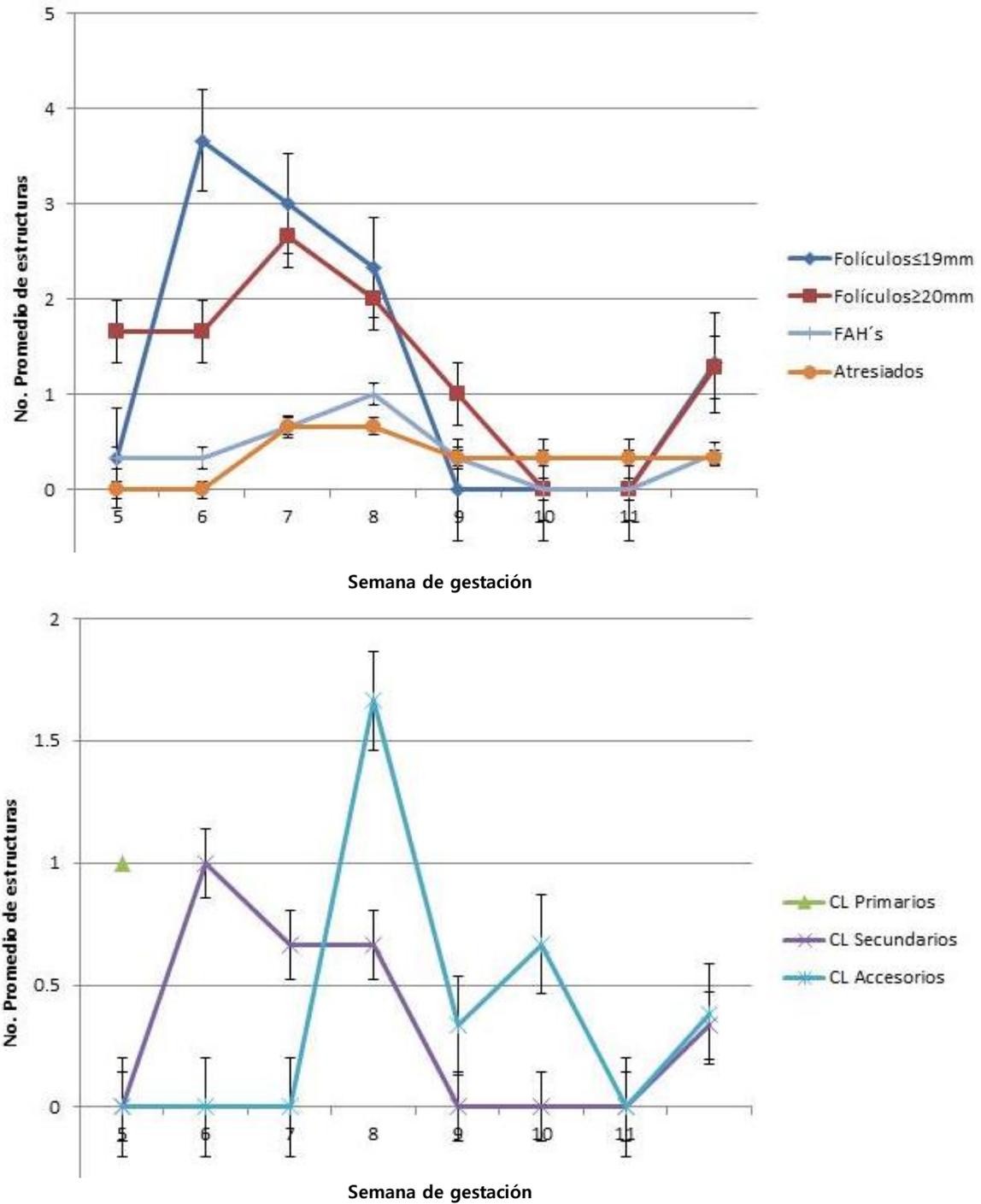


Figura 13. Resumen de la dinámica folicular y estructuras lúteas del grupo Control.

En el grupo Control, los folículos $\leq 19\text{mm}$ se encontraron en mayor promedio en la semana 6 (figura 13), correspondiendo a 3.6 estructuras, disminuyendo gradualmente hasta la semana 8 y cayendo abruptamente en la semana 9, los folículos $\geq 20\text{mm}$ evidenciaron un aumento desde las semanas 5 y 6, hasta llegar a su punto máximo en la semana 7 con una media de 2.6 estructuras por yegua, disminuyendo en las semanas 8 y 9 hasta no encontrarse más en la semana 10.

En la semana 8 las yeguas de este grupo presentaron la formación de 1 FAH por yegua en promedio.

La formación de CL Secundarios encuentra su media máxima en las semanas 6 con la formación de 1 estructura en promedio, este grupo formó en promedio 1.6 CL Accesorios durante la semana 8.

2. Concentraciones séricas de FSH

Subgrupo /semana	Anti-GnRHa	Anti-GnRHb	Anti-GnRH+hCG	Control	Promedio
5	2.076	0.594	0.080	0.780	0.883
6	1.270	0.732	0.559	1.879	2.545
7	1.061	1.056	0.918	2.106	1.286
8	1.113	0.666	0.202	2.221	1.051
9	1.072	0.458	0.215	0.623	0.592
10	1.072	0.652	0.360	1.051	0.784
11	1.072	0.317	1.886	1.223	1.124
Promedio	1.248	0.639	0.826	1.412	

Cuadro 3. Medias de los niveles séricos de FSH por subgrupo por semana.

***No existe diferencia significativa entre las medias de los grupos.**

De manera general las concentraciones séricas de FSH en todos los grupos fueron bajas en consideración a lo descrito en la literatura. No obstante los niveles más altos de la hormona se encontraron en la semana 6 con una media de 2.5 ng/ml y los niveles más bajos se encontraron en la semana 9.

El subgrupo 1 (AntiGnRHa) presentó los niveles séricos de FSH más altos a inicio del tratamiento con una concentración media de 2.07 ng/ml en la semana 5, debido quizás a que la disminución de la FSH por parte del Antarelix aún no se evidenciaba por completo en todas las yeguas del subgrupo, en las demás semanas del experimento la cantidad de FSH detectada en suero disminuyó cerca del 50%, manteniéndose así el resto del tratamiento (Cuadro 3).

El subgrupo 2 (AntiGnRHb) presentó los niveles séricos más altos en la semana 7 con una concentración media de 1.05 ng/ml y la más baja en la semana 11, siendo de 0.31ng/ml, presentando en total una disminución cerca del 70% (Cuadro 2).

El subgrupo 3 (AntiGnRH+hCG) presentó en la semana 6 la concentración media más alta no solo de su grupo sino de todo el experimento, siendo esta de 6.3 ng/ml; sin embargo, en la semana 5 presentó los niveles más bajos de esta hormona (0.07ng/ml), disminuyendo cerca del 98%; esto quizás pueda deberse a que algunos antagonistas juegan un papel de agonista promoviendo la liberación de GnRH y ésta su vez de FSH, sin embargo los estudios con Antarelix no han evidenciado completamente esta idea (Cuadro 3).

El subgrupo 4 (Control) alcanzó los niveles séricos más altos de FSH en la semana 8 con una media de 2.2 ng/ml, teniendo los niveles más bajos en la semana 9 con 0.62 ng/ml; a este subgrupo no se le administró el antagonista de GnRH por lo que se presume que las variaciones en esta gonadotropina corresponden a los ciclos normales de liberación de GnRH por el hipotálamo (Cuadro 3).

Hubo diferencia entre los tratamientos, sin embargo esta no resulta significativa.

3. Relación de las alteraciones en la dinámica folicular con los niveles séricos de FSH.

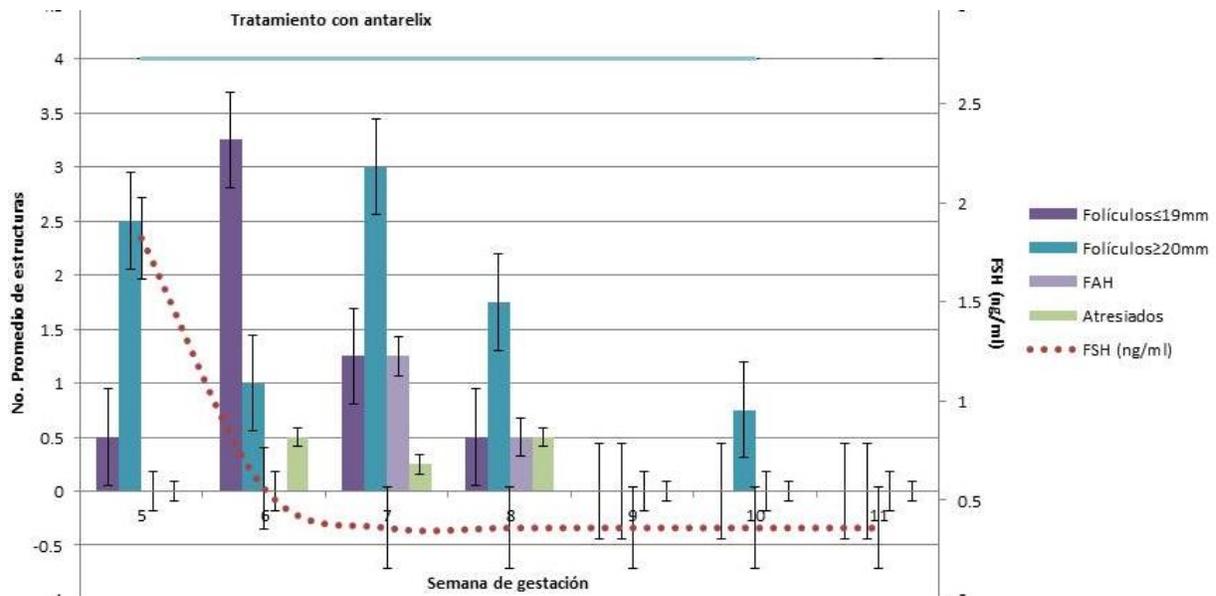


Figura 14. Relación de la dinámica folicular con la secreción de FSH en las yeguas del subgrupo Anti-GnRHα.

En la figura 14 podemos observar que la rápida disminución de FSH después de la semana 5, se asocia negativamente con la presencia de folículos $\leq 19\text{mm}$.

Los folículos $\leq 19\text{mm}$ alcanzaron su punto máximo en la semana 6 justo después de la disminución rápida de la FSH, se puede observar que casi el 80% de estos folículos continuó con su desarrollo ya que en la semana 7 se evidencian en promedio 3 folículos $\geq 20\text{mm}$.

En la semana 6 se encuentran en promedio un Fol $\geq 20\text{mm}$ y en la semana 8 puede notarse la formación de FAH que en esta semana alcanzaron su máximo promedio.

En las semanas 6, 7 y 8 pudieron observarse folículos que sufrieron de atresia sin embargo su mayor promedio no sobrepasó a .5 estructuras en las semanas 6 y 8.

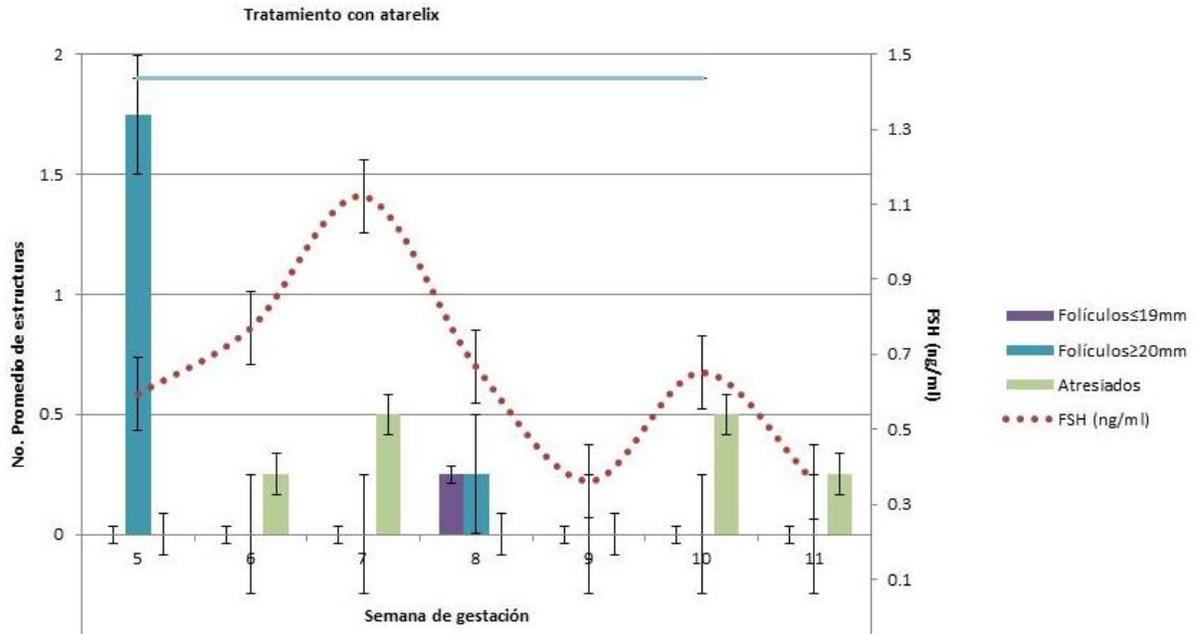


Figura 15. Relación de la dinámica folicular con la secreción de FSH en las yeguas del subgrupo Anti-GnRHb.

En la figura 15 se observa la dinámica folicular mostrada por el subgrupo Anti-GnRHb, yeguas a las que se les administró el antagonista de GnRH pero no tuvieron desarrollo folicular evidente.

A pesar de que los niveles de FSH fueron mayores comparados con las yeguas del subgrupo a Anti-GnRHb a las que también se les administró el antagonista bajo el mismo protocolo, las yeguas de este subgrupo no presentaron desarrollo folicular ni ovulaciones secundarias o formación de CL accesorios.

Los folículos presentes al inicio del estudio únicamente sufrieron de atresia. En la semana 7 se presenta un elevación evidente de las concentraciones de FSH y se infiere que como consecuencia de esta elevación en la semana 8 logra observarse una pequeña evidencia de desarrollo folicular, sin embargo estas estructuras no continúan su desarrollo y se atresian.

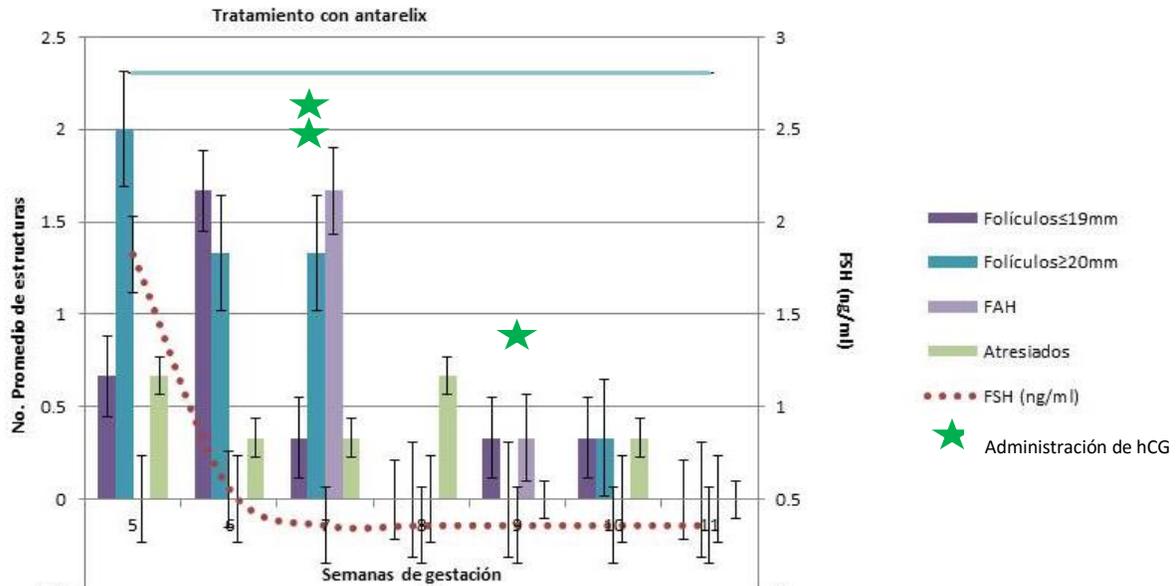


Figura 16. Relación de la dinámica folicular con la secreción de FSH en las yeguas del subgrupo Anti-GnRH+hCG

Los niveles de FSH en el subgrupo Anti-GnRH+hCG disminuyeron abruptamente después de la semana 5 de gestación manteniéndose de esta forma el resto del tratamiento.

Los folículos $\leq 19\text{mm}$ alcanzaron su punto máximo en la semana 6 justo después de la disminución rápida de la FSH, se puede observar que casi el 75% de estos folículos continuó con su desarrollo ya que en la semana 7 se evidencian en promedio 1.3 folículos $\geq 20\text{mm}$.

Dos de las yeguas de este grupo desarrollaron folículos de tamaño preovulatorio (35mm) en la semana 7, y se les administró hCG según el protocolo, estos folículos no ovularon. La otra yegua desarrolló un folículo de tamaño preovulatorio en la semana 9, de manera similar se administró la hCG de acuerdo al protocolo, este folículo tampoco ovuló.

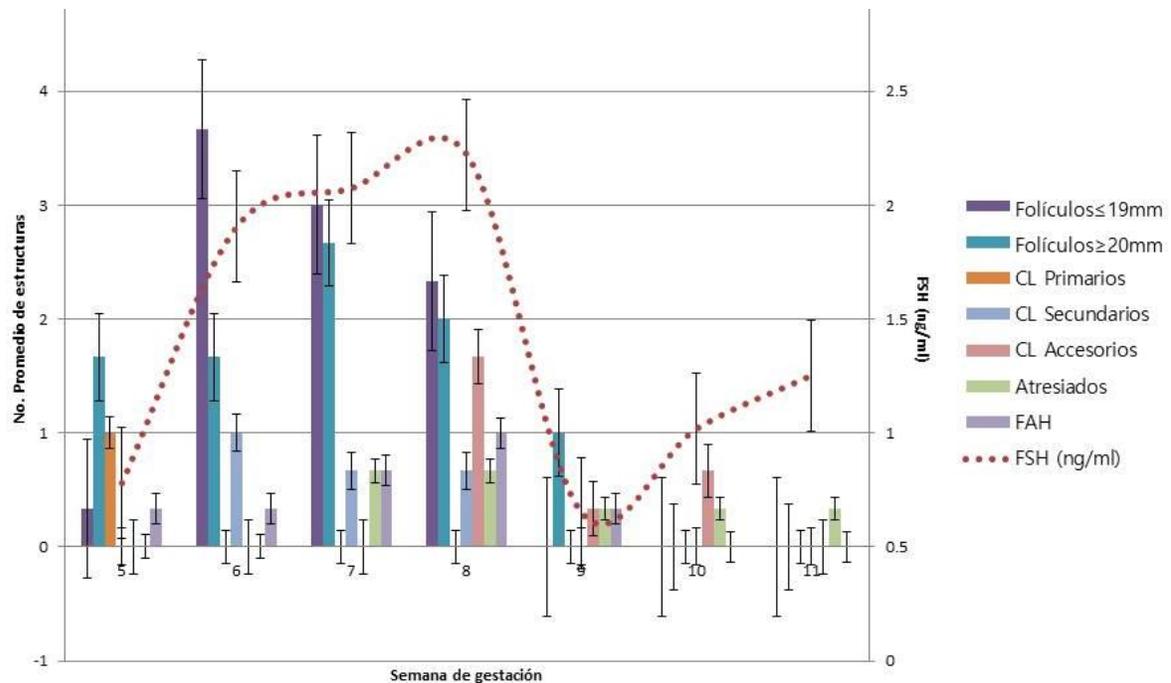


Figura 17. Relación de la dinámica folicular y estructuras lúteas con la secreción de FSH en las yeguas del grupo Control

En la figura 17 podemos observar la relación de la dinámica folicular con las tendencias séricas de FSH en yeguas a las que no se les administró el antagonista de GnRH.

El desarrollo folicular fue activo y constante; los niveles de FSH fueron los más elevados del estudio lo que confirma la disminución de las concentraciones séricas de esta gonadotropina por parte del antagonista de GnRH.

Puede observarse la correlación positiva entre el aumento de FSH y el desarrollo folicular en las semanas 6, 7 y 8. Sin embargo en las semanas 5 y 9 cuando los niveles de esta gonadotropina se encuentran cerca de .30ng/ml el promedio de estructuras foliculares ≤19mm también es menor.

Las yeguas de este grupo mostraron la formación de cuerpos lúteos suplementarios, formando al menos un cuerpo lúteo secundario en la semana 7, así como al menos un accesorio en la semana 8. Algunos folículos evidenciaron atresia. Sin embargo el promedio no llegó a 1.

De igual manera las yeguas de este grupo mostraron la falla en la ovulación de al menos un folículo de tamaño preovulatorio en la semana 8.

DISCUSIÓN

Se sabe que el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal regula la secreción de gonadotropinas de la hipófisis anterior mediante la secreción de GnRH; la Hormona Folículo Estimulante (FSH) para el crecimiento de los gametos y la Hormona Luteinizante (LH) para la maduración de los mismos y su liberación. (Gopurappilly, et al., 2013) La administración de un antagonista de GnRH permite mediante el bloqueo de los receptores de GnRH la supresión inmediata y específica de las gonadotropinas y se ha observado que el grado de dependencia a este es distinto para la FSH y LH (Briant et al., 2003), ya que la secreción de la primera se reduce alrededor de un 50% y de la segunda de 90-100%, sugiriendo que el control de la secreción de FSH solo está en parte regulado por la GnRH (Watson et al., 2000).

Watson (2000) observó el efecto de un antagonista de GnRH (Antarelix) en yeguas, la relación hipófisis/ovario; describiendo que los niveles de FSH disminuyen alrededor de un 50% al administrar el antagonista, sugiriendo que la secreción de FSH solo es en parte controlada por la liberación de GnRH. En el presente estudio los niveles de FSH de las yeguas tratadas con el Antagonista de GnRH mostraron una disminución mucho mayor, equiparable a la disminución de LH descrita en la literatura (90-100%); no obstante Watson (2000), en este mismo estudio describe haber obtenido niveles bajos de FSH en todas sus yeguas justificándolo en los tiempos de muestreo y en la longitud en la vida media de la gonadotropina en circulación, por lo cual declara sus estudios no concluyentes. Coincidiendo en este respecto con las concentraciones séricas de FSH en las yeguas del grupo control en las que si bien las concentraciones de FSH fueron más altas que a las de los grupos tratados, se consideran bajas de acuerdo a lo descrito por Bergfelt (2007).

Varios estudios que han realizado mediciones de las concentraciones de FSH indican un patrón de liberación en intervalos de 10 a 12 días, este patrón rítmico está controlado por diversos factores como la temporada, edad, raza y factores individuales (C. H. G. Irvine & Noordt, 1998); dicho patrón de secreción se continúa sin cambios en la gestación. En el tiempo en el que este estudio se llevó a cabo, dichos patrones de liberación que se pretendía observar en las yeguas, no tuvieron a bien ser vistos, no obstante Irvine y colaboradores (C. H. G. Irvine & Noordt) cuestionaron la efectividad de un muestreo cuyo intervalo fuese mayor a 4 horas, debido a que son muchas las variables que intervienen en la secreción de la FSH en la yegua, carecen de valor.

Los resultados de los subgrupos Anti-GnRH_a, Anti-GnRH+hCG y el grupo Control, concuerdan a lo descrito en la literatura. Acordando que la FSH tiene el control del reclutamiento y desarrollo hasta antes de la selección folicular principalmente (E. S. M. Silva et al., 2014), no obstante la desviación que involucra cambios importantes en el folículo dominante, están a cargo de la LH (Aurich, 2011). Apoyando a lo publicado por Irvine (1998) y Watson (2000) respecto a que la falta de consistencia (cantidad y frecuencia) en los patrones de secreción de FSH son capaces de promover el desarrollo folicular; ya que estos grupos a pesar de las concentraciones bajas de FSH evidenciaron desarrollo folicular; asimismo las yeguas del subgrupo Anti-GnRH_b en el que a pesar de tener concentraciones séricas de FSH mayores a los demás grupos tratados con el antagonista, no presentaron desarrollo folicular significativo.

Se sabe que aunque la eCG tiene muy poca afinidad por los receptores de LH, sin embargo la FSH actúa en sincronía con ésta para el desarrollo de los cuerpos lúteos suplementarios estimulando el surgimiento de oleadas foliculares en los ovarios de las yeguas gestantes (Cuervo-Arango, et al., 2015), como se evidenció en las yeguas del grupo Control a las que no se le administró el antagonista.

El hecho de que las yeguas del subgrupo Anti-GnRH_a (Figura 15) mantuvieran desarrollo folicular durante el tratamiento con Antarelix no concluye que este se considere normal, ya que si bien se evidenció desarrollo folicular y formación de estructuras lúteas suplementarias después del día 35 tal como lo indica (Stewart, 1993); también presentaron fallas en la ovulación de folículos, dando lugar a la formación de Folículos Anovulatorios Hemorrágicos. De acuerdo con Allen (2000) la eCG expresa actividad biológica similar a FSH y LH en la misma proporción y considera que la actividad biológica similar a la LH es la encargada de la ovulación o luteinización folicular para la formación de los cuerpos lúteos suplementarios que se desarrollan en la primera mitad de la gestación. No obstante la formación de FAH's en algunos de los folículos quizás se deba a algún factor que hasta la actualidad no se ha descrito.

El subgrupo AntiGnRH_b, inició el tratamiento con actividad folicular notable, sin embargo tras la administración del Antagonista de GnRH, la dinámica folicular no solo se suprimió, sino que fue acompañada de niveles bajos de FSH. No obstante estos niveles no fueron tan bajos como los de los demás subgrupos que recibieron el antagonista (Figura 16). Todas las yeguas del estudio son criollas, sin embargo una característica en común que presentaron las yeguas de este subgrupo es la talla, ya que se trató de yeguas con un tamaño mayor (aunque no significativo) que el de los demás grupos y quizás las concentraciones de FSH y la relación entre el volumen de sangre y las mismas propició a que no evidenciaran desarrollo folicular.

En el subgrupo Anto-GnRH+hCG, a diferencia de lo descrito por Briant et al. (2005) que administró Antarelix a yeguas con un folículo preovulatorio así como hCG como inductor de la ovulación, y consiguió que 5/10 yeguas ovularan; este trabajo evidenció que un tratamiento más largo con el antagonista disminuye a tal grado la liberación de gonadotropinas, que a pesar del apoyo por parte de la eCG, los folículos preovulatorios tras la administración de hCG como inductor de la ovulación, no ovularon y se formaron FAH's.

En yeguas el tratamiento con hCG resulta en un decremento inmediato del estradiol y en un incremento en las concentraciones de LH, induciendo la ovulación entre las 36 y las 42 horas después de su aplicación, (Cuervo-Arango et al., 2011) no obstante al verse suprimida la secreción de LH hipofisiaria por parte del antagonista, este grupo no ovuló los folículos preovulatorios y presentó la formación de Folículos Anovulatorios Hemorrágicos (Figura 17). Sin embargo Briant (2005) afirma que aunque la oleada de LH se vea suprimida por el antagonista de GnRH, la LH en niveles basales permite el desarrollo final del folículo.

Por otra parte el uso de Antarelix antes de la ovulación evita el incremento de la FSH posterior a esta, pudiendo interpretarse como un efecto directo en la glándula pituitaria observada también en yeguas ovariectomizadas, sin embargo en yeguas en las que el tratamiento con Antarelix se realizó a la mitad de la fase folicular, la FSH no se vio afectada sugiriendo que la dependencia de la FSH a la GnRH es diferente dependiendo de la etapa del ciclo estral en al que se encuentre y a condiciones individuales ya antes descritas (Briant et al., 2005).

CONCLUSIONES

Los resultados en este estudio concluyen que el Antagonista de GnRH (Antarelix) administrado a yeguas con gestación equina, afecta negativamente la dinámica folicular esperada en esta etapa.

Asimismo las concentraciones séricas de FSH se ven disminuidas, no obstante en este estudio la disminución de las mismas rebasa a lo descrito anteriormente por la literatura (50%). Se necesitan más estudios con un protocolo de muestreo distinto para evaluar su comportamiento y dependencia.

Se asume que gran parte del desarrollo folicular así como el desarrollo de estructuras lúteas suplementarias que se encontraron en los subgrupos a los que se administró el Antagonista de GnRH se deben a la actividad biológica de la eCG similar a la FSH y LH.

Se acepta la hipótesis de que la secreción de FSH en yeguas con gestación equina tratadas con un antagonista de GnRH con o sin hCG disminuye de tal manera que los folículos no se desarrollan de manera habitual, sin embargo al no obtener diferencia significativa entre tratamientos, se concluye de igual manera seguir investigando este tópico.

ANEXOS

Comparaciones de Medias por grupo de FSH.

Subgrupo	Subgrupo (J)	Diferencia de
----------	--------------	---------------

(I)		medias (I-J) FSH
1	2	.609
	3	.422
	4	.164
2	1	.609
	3	.187
	4	.773
3	1	.422
	2	.187
	4	.586
4	1	.164
	2	.773
	3	.586

Cuadro 4. Comparaciones por pares de las medias marginales estimadas basadas en la escala original de la variable dependiente. No hay diferencia entre las medias ($p=.05$)

Resumen de la dinámica folicular y niveles séricos de FSH por yegua

Yegua 1. "Zapatito".- Subgrupo 1. Anti GnRH α

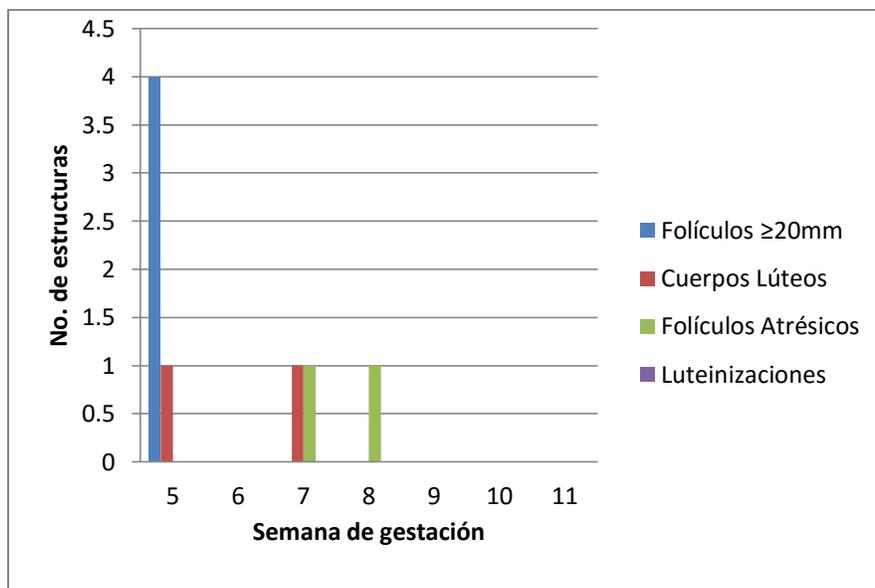


Figura 18. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 1. "Zapatito" perteneciente al subgrupo Anti GnRH_a

Semana de gestación	FSH sérica (ng/ml)
5	1.38
6	0.36
7	0.36
8	0.36
9	0.36
10	0.36
11	0.36
Total general	0.48

Cuadro 5. Medias por semana de FSH de yegua 1 "Zapatito" perteneciente al subgrupo Anti GnRH_a

Yegua 2. "Lady Xoc".- Subgrupo 2. Anti GnRH_b

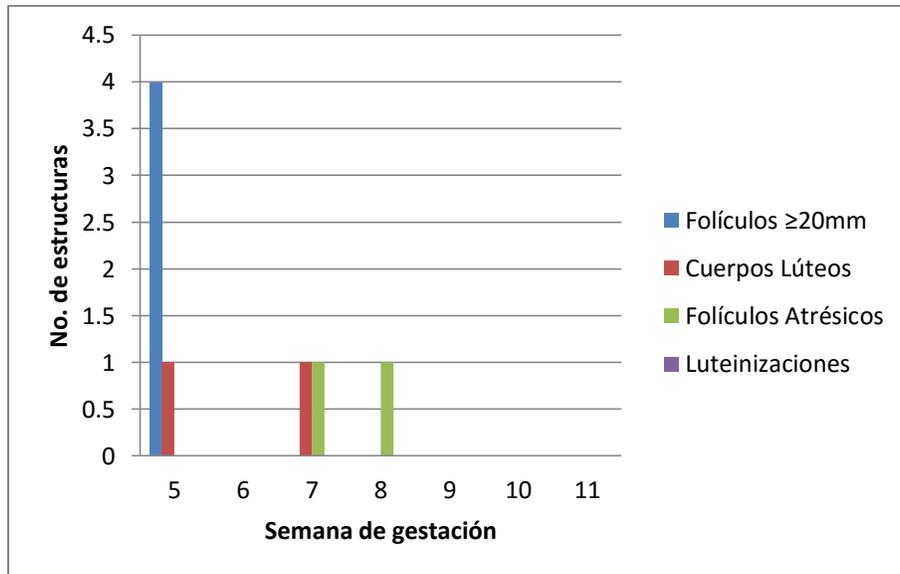


Figura 19. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 2. "Lady Xoc" perteneciente al subgrupo Anti GnRHb..

Semana de gestación	FSH sérica (ng/ml)
5	0.36
6	0.36
7	0.36
8	0.36
9	0.36
10	0.36
11	0.36
Total general	0.36

Cuadro 6. Medias por semana de FSH de yegua 2 "Lady Xoc" perteneciente al subgrupo Anti GnRHb.

Yegua 3. "Valentina".- Subgrupo 2. Anti GnRHb

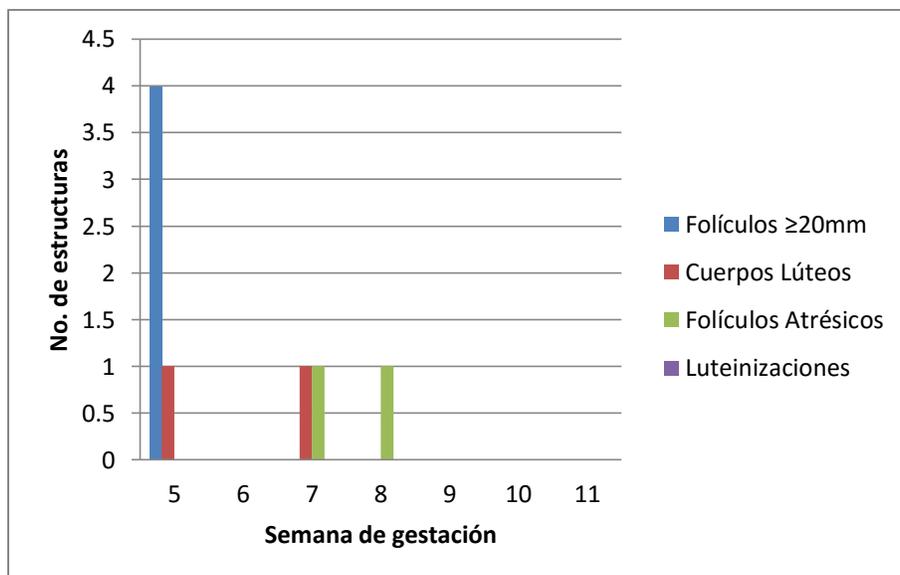


Figura 20. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 3. "Valentina" perteneciente al subgrupo Anti GnRHb.

Semana de gestación	FSH sérica (ng/ml)
5	1.30
6	1.80
7	2.47
8	1.19
9	0.37
10	0.36
11	0.36
Total general	1.27

Cuadro 7. Medias por semana de FSH de yegua 3 "Valentina" perteneciente al subgrupo Anti GnRHb.

Yegua 4. "Diez".- Subgrupo 1. Anti GnRH_a

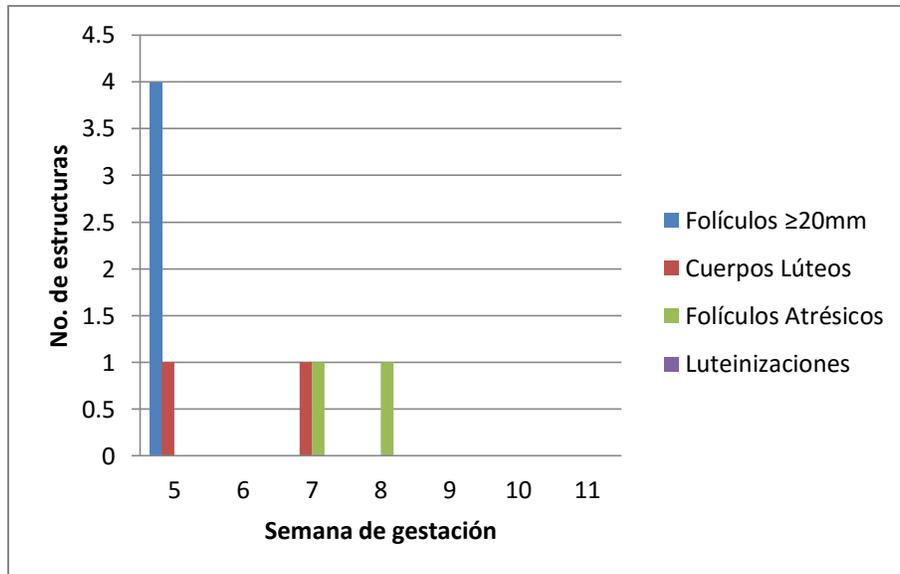


Figura 21. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 4. "Diez" perteneciente al subgrupo Anti GnRHa

Semana de gestación	FSH sérica (ng/ml)
5	0.86
6	1.15
7	0.36
8	0.36
9	0.36
10	0.36
11	0.36
Total general	0.52

Cuadro 8. Medias por semana de FSH de yegua 4 "Diez" perteneciente al subgrupo Anti GnRH a.

Yegua 5. "Lady Di".- Subgrupo 2. Anti GnRH b

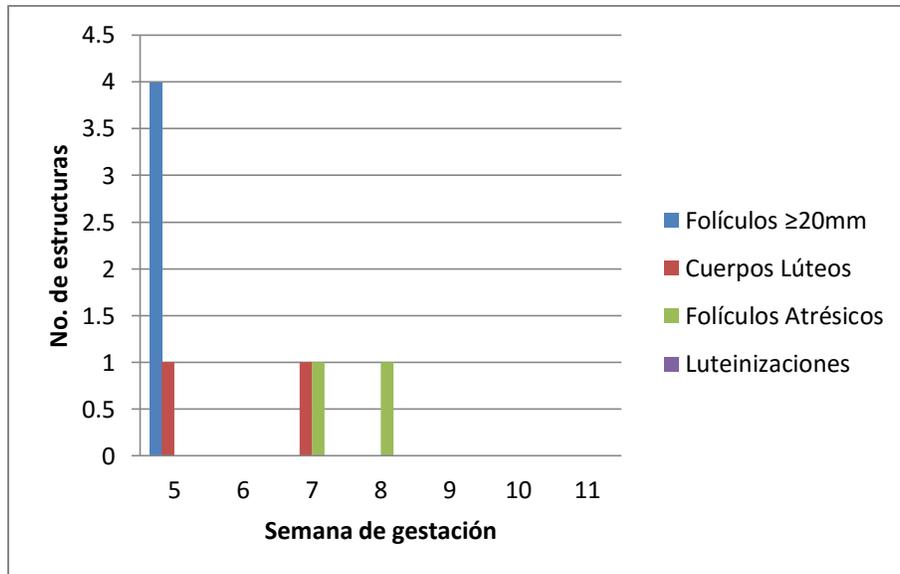


Figura 22. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 5. "Lady Di" perteneciente al subgrupo Anti GnRHb.

Semana de gestación	FSH sérica (ng/ml)
5	0.36
6	0.36
7	0.36
8	0.36
9	0.36
10	0.36
11	0.36
Total general	0.36

Cuadro 9. Medias por semana de FSH de yegua 5 "Lady Di" perteneciente al subgrupo Anti GnRHb.

Yegua 6. "Candela".- Subgrupo 2. Anti GnRHb

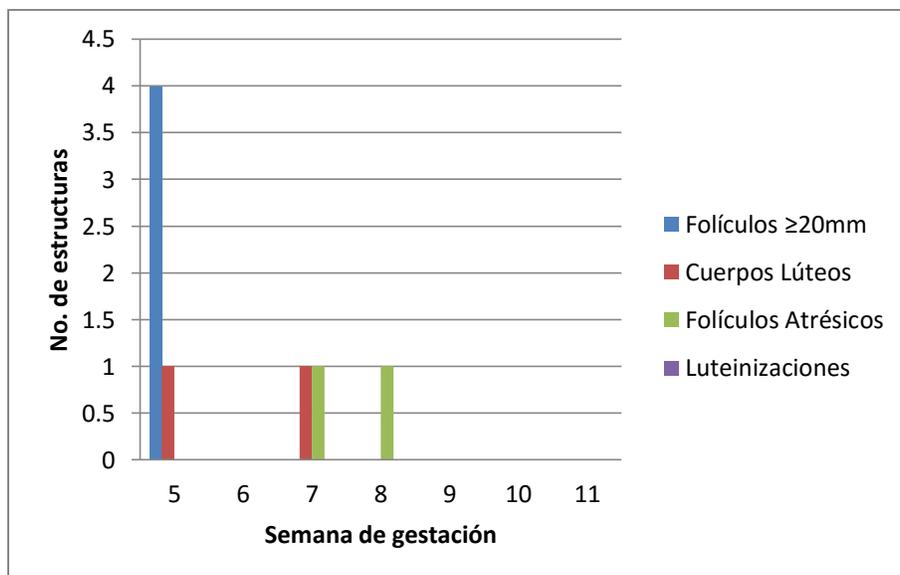


Figura 23. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 6. "Candela" perteneciente al subgrupo Anti GnRHb.

Semana de gestación	FSH sérica (ng/ml)
5	0.36
6	0.36
7	0.63
8	0.76
9	0.36
10	1.53
11	0.36
Total general	0.64

Cuadro 10. Medias por semana de FSH de yegua 6 "Candela" perteneciente al subgrupo Anti GnRHb

. Yegua 7. "Trece".- Subgrupo 1 Anti GnRHb

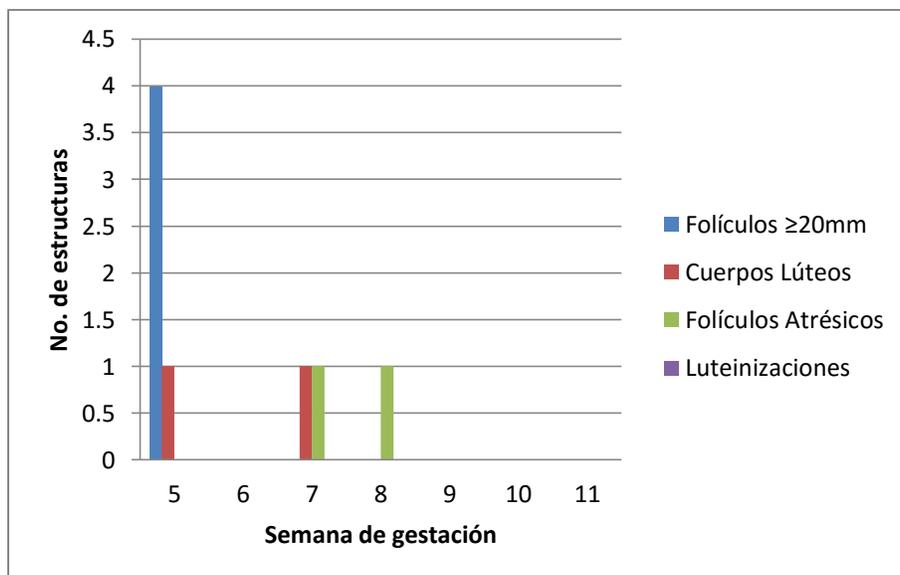


Figura 24. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 7. "Trece" perteneciente al subgrupo Anti GnRH_a.

Semana de gestación	FSH sérica (ng/ml)
5	2.41
6	0.36
7	0.36
9	0.36
10	0.36
11	0.36
Total general	0.70

Cuadro 11. Medias por semana de FSH de yegua 7 "Trece" perteneciente al subgrupo Anti GnRH_a.

Yegua 8. "Alfa 1".- Subgrupo 1 Anti GnRH_a

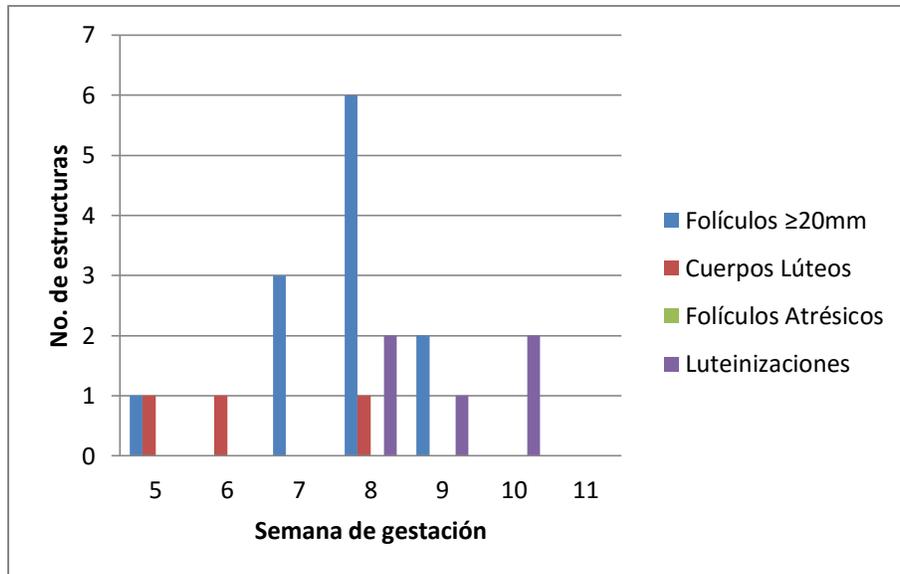


Figura 25. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 8. "Alfa 1" perteneciente al subgrupo Anti GnRHa.

Semana de gestación	FSH sérica (ng/ml)
5	2.64
6	0.36
7	0.36
8	0.36
9	0.36
10	0.36
11	0.36
Total general	0.63

Cuadro 12. Medias por semana de FSH de yegua 8 "Alfa 1" perteneciente al subgrupo Anti GnRHa.

Yegua 9. "Dos".- Subgrupo 3. Anti GnRH+hCG

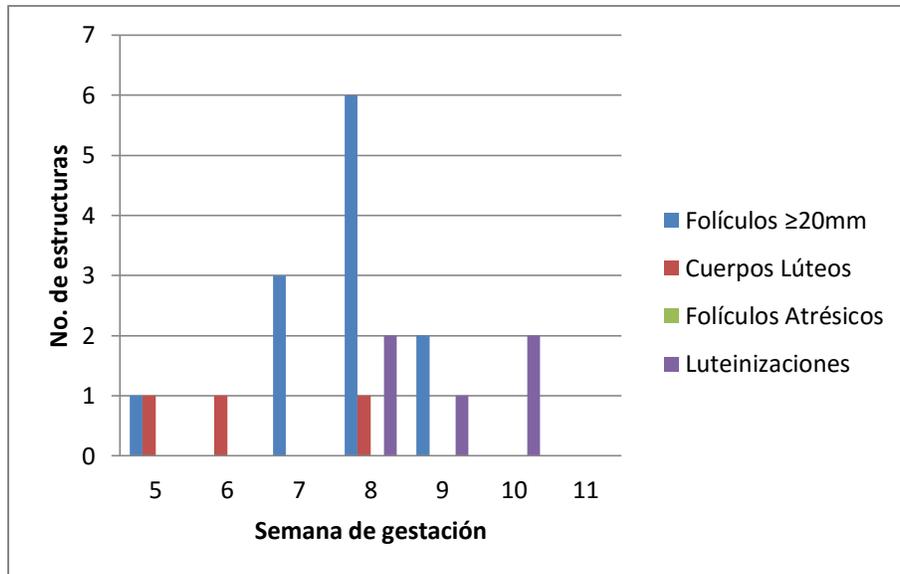


Figura 26. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 9. “Dos” perteneciente al subgrupo Anti GnRH+hCG.

Semana de gestación	FSH sérica (ng/ml)
5	0.36
6	0.36
7	0.36
8	0.36
9	0.36
10	0.36
Total general	0.39

Cuadro 13. Medias por semana de FSH de yegua 9 “Dos” perteneciente al subgrupo Anti GnRH+hCG.

Yegua 10. “Nueve”.- Subgrupo 3. Anti GnRH+hCG

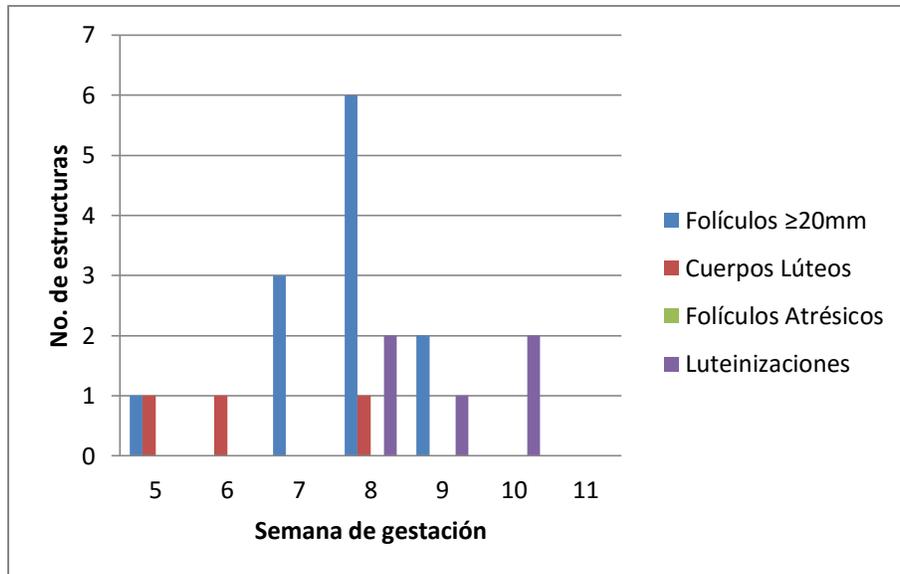


Figura 27. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 10. "Nueve" perteneciente al subgrupo Anti GnRH+hCG.

Semana de gestación	FSH sérica (ng/ml)
5	0.36
6	0.36
7	0.36
8	0.36
9	0.36
10	0.36
Total general	0.36

Cuadro 14. Medias por semana de FSH de yegua 10 "Nueve" perteneciente al subgrupo Anti GnRH+hCG.

Yegua 11. "Tres".- Subgrupo 3. Anti GnRH+hCG

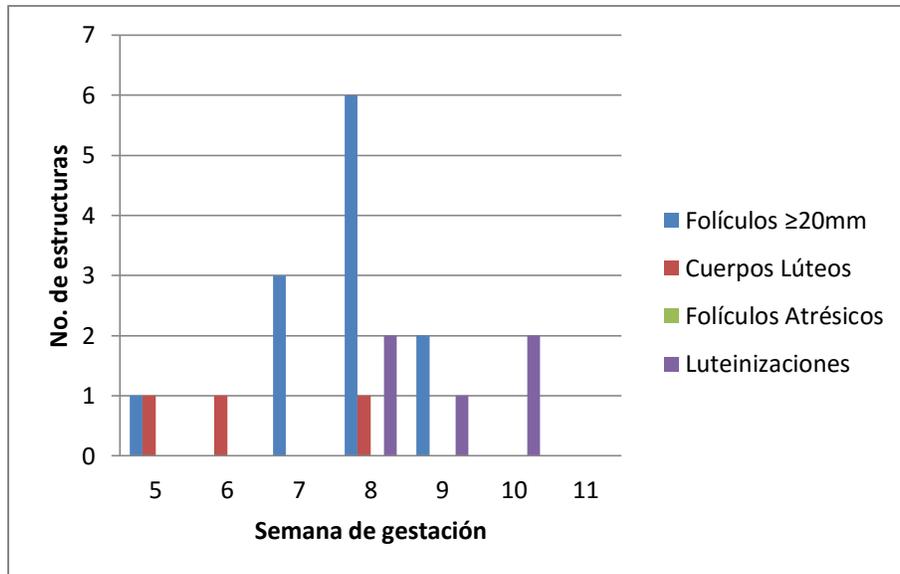


Figura 28. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 11. "Tres" perteneciente al subgrupo Anti GnRH+hCG.

Semana de gestación	FSH sérica (ng/ml)
5	0.45
6	18.18
7	2.30
8	0.36
9	0.36
10	0.36
11	0.36
Total general	3.20

Cuadro 15. Medias por semana de FSH de yegua 11 "Tres" perteneciente al subgrupo Anti GnRH+hCG.

Yegua 12. "Alfa 2".- Subgrupo 4 Control

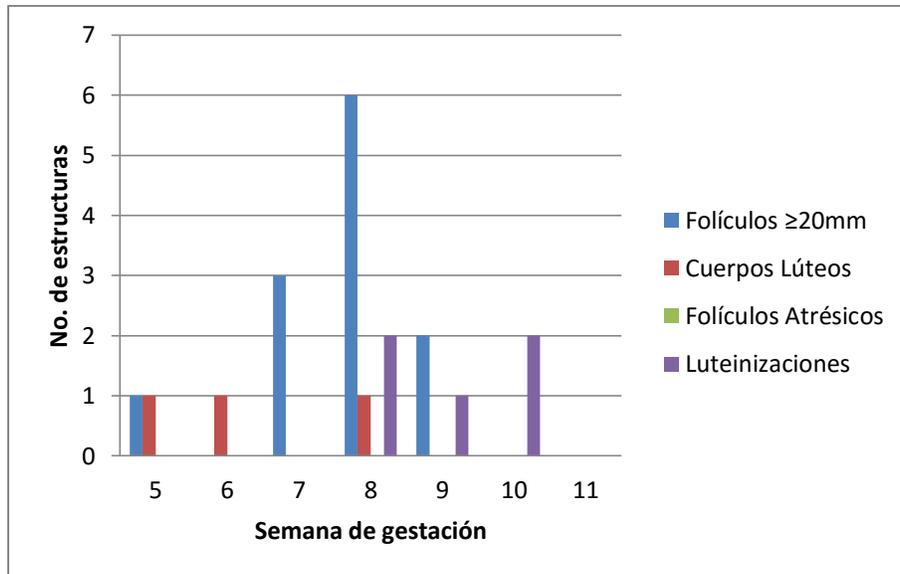


Figura 29. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 12. "Alfa 2" perteneciente al subgrupo Control.

Semana de gestación	FSH sérica (ng/ml)
5	0.98
6	0.76
7	0.64
8	3.15
9	0.62
10	0.47
11	1.79
Total general	1.31

Cuadro 16. Medias por semana de FSH de yegua 12 "Alfa 2" perteneciente al subgrupo Control.

Yegua 13. "Rumba".- Subgrupo 4. Control

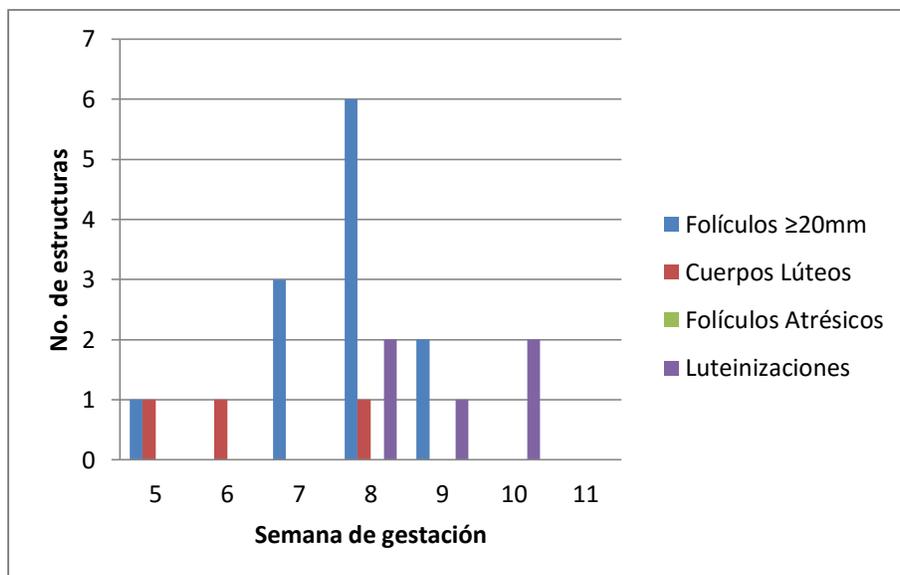


Figura 30. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 13. "Rumba" perteneciente al subgrupo Control.

Semana de gestación	FSH sérica (ng/ml)
5	0.99
6	2.46
7	2.11
8	0.36
9	0.65
10	1.63
11	1.22
Total general	1.31

Cuadro 17. Medias por semana de FSH de yegua 13 "Rumba" perteneciente al subgrupo Control.

Yegua 14. "Samba".- Subgrupo 4. Control

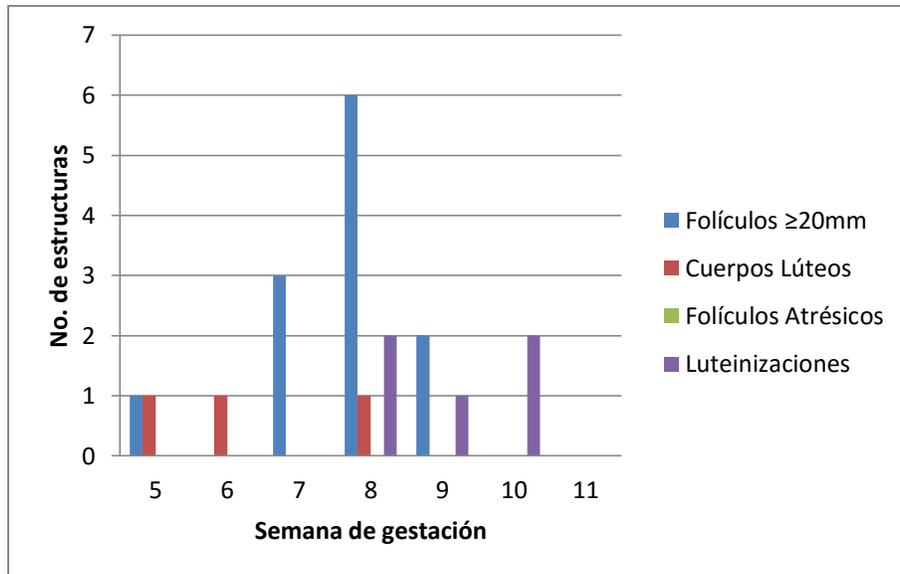


Figura 31. Resumen total de la dinámica folicular de la yegua 14. "Samba" perteneciente al subgrupo Control.

Semana de gestación	FSH sérica (ng/ml)
5	0.37
6	2.77
7	3.44
8	3.15
9	0.67
10	0.36
11	0.91
Total general	1.57

Cuadro 18. Medias por semana de FSH de yegua 14 "Samba" perteneciente al subgrupo Control.

LITERATURA CITADA

- Adams, T. E., Horton, M. B., Watson, J. G., & Adams, B. M. (1986). Biological activity of Luteinizing Hormone (LH) during the estrous cycle of mares. *Domestic Animal Endocrinology*, 3(2), 69-77. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0739-7240\(86\)90013-5](http://dx.doi.org/10.1016/0739-7240(86)90013-5)
- Alves, K. A., Alves, B. G., Gastal, G. D. A., de Tarso, S. G. S., Gastal, M. O., Figueiredo, J. R., . . . Gastal, E. L. (2016). The Mare Model to Study the Effects of Ovarian Dynamics on Preantral Follicle Features. *PLoS ONE*, 11(2), 1-18. doi: 10.1371/journal.pone.0149693
- Allen, W. R. (1984). Hormonal control of early pregnancy in the mare. *Animal Reproduction Science*, 7(1-3), 283-304. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320\(84\)90040-X](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320(84)90040-X)
- Allen, W. R., & Wilsher, S. (2009). A Review of Implantation and Early Placentation in the Mare. *Placenta*, 30(12), 1005-1015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2009.09.007>
- Argo, C. M., & Turnbull, E. B. (2010). The effect of intra-uterine devices on the reproductive physiology and behaviour of pony mares. *The Veterinary Journal*, 186(1), 39-46. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.07.013>
- Aurich, C. (2011). Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science*, 124(3-4), 220-228. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.005>
- Balasz, J., & Fábregues, F. (2006). LH in the follicular phase: neither too high nor too low. *Reproductive BioMedicine Online*, 12(4), 406-415. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61991-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61991-8)
- Barri, P. N., Martinez, F., Coroleu, B., & Tur, R. (2002). The role of GnRH antagonists in assisted reproduction. *Reproductive BioMedicine Online (Reproductive Healthcare Limited)*, 5(S1), 14-19.
- Bergfelt, D. R. (2009). Chapter 11 - Anatomy and Physiology of the Mare A2 - Samper, Juan C *Equine Breeding Management and Artificial Insemination (SECOND EDITION)* (pp. 113-131). Saint Louis: W.B. Saunders.
- Bergfelt, D. R., & Adams, G. P. (2007). CHAPTER 1 - Ovulation and Corpus Luteum Development A2 - Samper, Juan C. In J. F. Pycock & A. O. McKinnon (Eds.), *Current Therapy in Equine Reproduction* (pp. 1-13). Saint Louis: W.B. Saunders.
- Bergfelt, D. R., & Ginther, O. J. (1986). Follicular populations following inhibition of follicle stimulating hormone with equine follicular fluid during early pregnancy in the mare. *Theriogenology*, 26(6), 733-747. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(86\)90004-X](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(86)90004-X)
- Bergfelt, D. R., & Ginther, O. J. (1993). Relationships between FSH surges and follicular waves during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*, 39(4), 781-796. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90418-5](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(93)90418-5)
- Bergfelt, D. R., Pierson, R. A., & Ginther, O. J. (1989). Resurgence of the primary corpus luteum during pregnancy in the mare. *Animal Reproduction Science*, 21(3-4), 261-270. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320\(89\)90033-X](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320(89)90033-X)
- Betteridge, K. J. (2000). Comparative aspects of equine embryonic development. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 691-702. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00075-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00075-0)
- Betteridge, K. J. (2007). Equine embryology: An inventory of unanswered questions. *Theriogenology*, 68, Supplement 1, S9-S21. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.037>
- Boeta, A. M., Calderon, F., Costilla, C., & Zarco, L. (2014). Effect of a GNRH antagonist on follicular development, luteal function and fetal viability in mares carrying equine or mule

- pregnancies. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(1), 202-203. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2013.10.148>
- Boeta, M., Porras, A., Zarco, L. A., & Aguirre-Hernández, R. (2006). Ovarian activity of the mare during winter and spring at a latitude of 19° 21' north. *Journal of Equine Veterinary Science*, 26(2), 55-58. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2005.12.003>
- Boeta, M., & Zarco, L. (2005). Progesterone and equine chorionic gonadotropin concentrations around the time of pregnancy loss in mares impregnated by donkeys or stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*, 25(12), 531-538. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2005.10.007>
- Briant, C., Ottogalli, M., & Guillaume, D. (2004). Attempt to control the day of ovulation in cycling pony mares by associating a GnRH antagonist with hCG. *Domestic Animal Endocrinology*, 27(2), 165-178. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2004.03.004>
- 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. *Domestic Animal Endocrinology*, 24(4), 305-322. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0739-7240\(03\)00012-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0739-7240(03)00012-2)
- Brüssow, K. P., Schneider, F., & Nürnberg, G. (2001). Alteration of gonadotrophin and steroid hormone release, and of ovarian function by a GnRH antagonist in gilts. *Animal Reproduction Science*, 66(1-2), 117-128. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00093-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00093-8)
- C. H. G. Irvine, J. E. T., S. L. Alexander, N. Shand and, & Noordt, S. v. (1998). Gonadotrophin profiles and dioestrous pulsatile release patterns in mares as determined by collection of jugular blood at 4 h intervals throughout an oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 113, 315-322.
- Calderon López, F., sustentante, Boeta Acosta, A. M., asesor, institución que otorga el, g., & Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y, Z. (2012). *Efecto de un antagonista de gnrh sobre la función lútea y la viabilidad fetal en gestaciones equinas y mulares*. (Dissertation/Thesis), Universidad Nacional Autónoma de México. Retrieved from http://conricyt1.summon.serialssolutions.com/2.0.0/link/0/eLvHCXMwfV09T8MwELVQFyQWECA-pRN7E8dO0ngurWBgIZ1YqIpsIEiJU5oWqb-LjbV_jLslplqhg78tS7737s7PQmgVyOG_O0HrEpVVJrJSm1SZkXRZYQpUBUHqAvtHr7nOX_XbS0K88e-XRaJKgYqzwASRScLI2pK5UmHH-R6ulcoYEprpja4On1lckPhmU_Ob6ixiHf1A9vJ6Hps9mzE9FSePe7HuM3Hk_LIYTjh9ogXrYOO_BdoWLLrVrkUsWfvUOXUzQo3AFqfafXmod990ErDlws-qV8S1aKF0hJvBeeAIErasONSB-9hUHjtq3HB-gesuxMN0Mhs_DXI9819nzXw2ySW73FPCBclIX4qBp-5XAhzqJHIYZZgQCMAUjc5GZRYn0mKJNr4WtwcGujlYeycG69XG3Ytj4uB0_W7X0Q9GWYPG
- Castro, T., Oliveira, F. A., Siddiqui, M. A. R., Baldrighi, J. M., Wolf, C. A., & Ginther, O. J. (2015). Stimulation of LH, FSH, and luteal blood flow by GnRH during the luteal phase in mares. *Theriogenology*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.019>
- Clarke, I. J., & Pompolo, S. (2005). Synthesis and secretion of GnRH. *Animal Reproduction Science*, 88(1-2), 29-55. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.05.003>
- Conley, A. J. (2016). Review of the reproductive endocrinology of the pregnant and parturient mare. *Theriogenology*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.049>
- Copperman, A. B., & Benadiva, C. (2013). Optimal usage of the GnRH antagonists: a review of the literature. *Reproductive Biology & Endocrinology*, 11(1), 1-2. doi: 10.1186/1477-7827-11-20
- Costilla-Arias, C. I. (2011). *Desarrollo Folicular en gestaciones equinas y mulares tratadas con un antagonista de GnRH*. (Tesis de Maestría), Universidad Nacional Autónoma de México.

- Cota Ana Marcia M, J. B. A. O., Claudia G Petersen, Ana L Mauri, Fabiana C Massaro, Liliane FI Silva, Andreia Nicoletti, Mario Cavagna, Ricardo LR Baruffi, José Franco Jr. (2012). GnRH agonist versus GnRH antagonist in assisted reproduction cycles: oocyte morphology. *Reproductive Biology & Endocrinology*, 10(33). doi: 10.1186/1477-7827-10-33
- Cuervo-Arango, J., Aguilar, J. J., Vettorazzi, M. L., & Martínez-Boví, R. (2015). eCG concentrations, luteal structures, return to cyclicity, and postabortion fertility in embryo transfer recipient mares. *Theriogenology*, 84(6), 1003-1013. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.038>
- Cuervo-Arango, J., Beg, M. A., & Ginther, O. J. (2011). Follicle and systemic hormone interrelationships during induction of luteinized unruptured follicles with a prostaglandin inhibitor in mares. *Theriogenology*, 76(2), 361-373. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.015>
- Cuervo-Arango, J., & Domingo-Ortiz, R. (2011). Systemic treatment with high dose of flunixin-meglumine is able to block ovulation in mares by inducing hemorrhage and luteinisation of follicles. *Theriogenology*, 75(4), 707-714. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.011>
- Cuervo-Arango, J., & Newcombe, J. R. (2010). Risk Factors for the Development of Haemorrhagic Anovulatory Follicles in the Mare. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(3), 473-480. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01260.x
- Checura, C. M., Beg, M. A., Gastal, E. L., Gastal, M. O., Wiltbank, M. C., Parrish, J. J., & Ginther, O. J. (2009). Effect of Suppression of FSH with a GnRH Antagonist (Acyline) Before and During Follicle Deviation in the Mare. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(3), 504-511. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01222.x
- de Mestre, A. M., Bacon, S. J., Costa, C. C., Leadbeater, J. C., Noronha, L. E., Stewart, F., & Antczak, D. F. (2008). Modeling Trophoblast Differentiation using Equine Chorionic Girdle Vesicles. *Placenta*, 29(2), 158-169. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2007.10.005>
- Deghenghi, R., Boutignon, F., Wüthrich, P., & Lenaerts, V. (1993). Antarelix (EP 24332) a novel water soluble LHRH antagonist. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 47(2-3), 107-110. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0753-3322\(93\)90299-Z](http://dx.doi.org/10.1016/0753-3322(93)90299-Z)
- Dippert, K. D., Ray, B. S., & Squires, E. L. (1995). Aspiration of the dominant follicle in mares and its effect on subsequent follicular development. *Animal Reproduction Science*, 40(1-2), 77-88. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320\(95\)01409-S](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320(95)01409-S)
- Donadeu, F. X., & Pedersen, H. G. (2008). Follicle Development in Mares. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 224-231. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01166.x
- Engel, J. B., Griesinger, G., Schultze-Mosgau, A., Felberbaum, R., & Diedrich, K. (2006). GnRH agonists and antagonists in assisted reproduction: pregnancy rate. *Reproductive BioMedicine Online (Reproductive Healthcare Limited)*, 13(1), 84-87.
- Engel, J. B., Riethmüller-Winzen, H., & Diedrich, K. (2005). Extrapituitary effects of GnRH antagonists in assisted reproduction: a review. *Reproductive BioMedicine Online (Reproductive Healthcare Limited)*, 10(2), 230-234.
- Engel, J. B., Schultze-Mosgau, A., & Diedrich, K. (2005). Five years' clinical use of GnRH antagonists: evaluation of safety and allergic potential. *Reproductive BioMedicine Online*, 10, Supplement 3, 61-65. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(11\)60392-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(11)60392-1)
- Epifano, O., & Dean, J. (2002). Genetic control of early folliculogenesis in mice. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 13(4), 169-173. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1043-2760\(02\)00576-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1043-2760(02)00576-3)
- Ferreira, R. M., Ayres, H., Sales, J. N. S., Souza, A. H., Rodrigues, C. A., & Baruselli, P. S. (2013). Effect of different doses of equine chorionic gonadotropin on follicular and luteal

- dynamics and P/AI of high-producing Holstein cows. *Animal Reproduction Science*, 140(1–2), 26-33. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.04.014>
- Gigli I, R. A., Aguero A. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *In vet*, 8, 183-204.
- Ginther, O. J., Beg, M. A., Gastal, E. L., Gastal, M. O., & Cooper, D. A. (2009). Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17 β -estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. *Animal Reproduction Science*, 114(1–3), 311-317. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.08.026>
- Ginther, O. J., Gastal, E. L., Gastal, M. O., & Beg, M. A. (2007). Incidence, Endocrinology, Vascularity, and Morphology of Hemorrhagic Anovulatory Follicles in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 27(3), 130-139. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2007.01.009>
- Ginther, O. J., Gastal, E. L., Rodrigues, B. L., Gastal, M. O., & Beg, M. A. (2008). Follicle diameters and hormone concentrations in the development of single versus double ovulations in mares. *Theriogenology*, 69(5), 583-590. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.11.004>
- Ginther, O. J., Gastal, M. O., Gastal, E. L., Jacob, J. C., & Beg, M. A. (2009). Age-related dynamics of follicles and hormones during an induced ovulatory follicular wave in mares. *Theriogenology*, 71(5), 780-788. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.051>
- Gobello, C. (2007). New GnRH analogs in canine reproduction. *Animal Reproduction Science*, 100(1–2), 1-13. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.08.024>
- González-Valle, F., Batista-Arteaga, M., & Gracia-Molina, A. (1998). Follicular atresia and LH concentrations during the follicular phase of the estrous cycle in the goat (*Capra hircus*). *Animal Reproduction Science*, 51(1), 23-30. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(97\)00055-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(97)00055-9)
- Gopurappilly, R., Ogawa, S., & Parhar, I. S. (2013). Functional significance of GnRH and kisspeptin, and their cognate receptors in teleost reproduction. *Frontiers in Endocrinology*, 4, 1-13. doi: 10.3389/fendo.2013.00024
- Hinojosa, A. M., Bloeser, J. R., Thomson, S. R. M., & Watson, E. D. (2001). The effect of a GnRH antagonist on endocrine and seminal parameters in stallions. *Theriogenology*, 56(5), 903-912. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00617-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00617-3)
- Hinrichs, K. (2016). A journey through people, places, and projects in equine assisted reproduction. *Theriogenology*, 86(1), 1-10. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.014>
- Huirne, J. A. F., & Lambalk, C. B. (2001). Gonadotropin-releasing-hormone-receptor antagonists. *The Lancet*, 358(9295), 1793-1803. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06797-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06797-6)
- Kingma, S. E. G., Thibault, M. E., Betteridge, K. J., Schlaf, M., Gartley, C. J., & Chenier, T. S. (2011). Permeability of the equine embryonic capsule to ethylene glycol and glycerol in vitro. *Theriogenology*, 76(8), 1540-1551. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.026>
- Klein, C., & Troedsson, M. H. T. (2012). Equine Pre-Implantation Conceptuses Express Neuraminidase 2 - A Potential Mechanism for Desialylation of the Equine Capsule. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(3), 449-454. doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01901.x
- Kraus, S., Naor, Z., & Seger, R. (2001). Intracellular Signaling Pathways Mediated by the Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptor. *Archives of Medical Research*, 32(6), 499-509. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0188-4409\(01\)00331-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0188-4409(01)00331-9)

- Krsmanovic, L. Z., Hu, L., Leung, P.-K., Feng, H., & Catt, K. J. (2010). Pulsatile GnRH secretion: Roles of G protein-coupled receptors, second messengers and ion channels. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 314(2), 158-163. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2009.05.015>
- Landomiel, F., Gallay, N., Jégot, G., Tranchant, T., Durand, G., Bourquard, T., . . . Reiter, E. (2014). Biased signalling in follicle stimulating hormone action. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 452-459. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.035>
- Lunn, P., Vagnoni, K. E., & Ginther, O. J. (1997). The equine immune response to endometrial cups. *Journal of Reproductive Immunology*, 34(3), 203-216. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0378\(97\)00044-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0378(97)00044-2)
- Mihm, M., & Evans, A. C. O. (2008). Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. *Reproduction In Domestic Animals = Zuchthygiene*, 43 Suppl 2, 48-56. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01142.x
- Millar, R. P. (2003). GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 14(1), 35-43. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1043-2760\(02\)00016-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1043-2760(02)00016-4)
- Millar, R. P. (2005). GnRHs and GnRH receptors. *Animal Reproduction Science*, 88(1–2), 5-28. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.05.032>
- Padula, A. M. (2005). GnRH analogues—agonists and antagonists. *Animal Reproduction Science*, 88(1–2), 115-126. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.05.005>
- Palermo, R. (2007). Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reproductive BioMedicine Online*, 15(3), 326-337. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60347-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60347-1)
- Perera-Marín, G., Murcia, C., & González-Padilla, E. (2007). Luteinizing hormone (LH) isoforms in ruminants: Characterization and physiological relevance. *Animal Reproduction Science*, 101(3–4), 187-207. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.03.011>
- Pessoa, G. A., Martini, A. P., Carloto, G. W., Rodrigues, M. C. C., Claro Júnior, I., Baruselli, P. S., . . . Sá Filho, M. F. (2016). Different doses of equine chorionic gonadotropin on ovarian follicular growth and pregnancy rate of suckled Bos taurus beef cows subjected to timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*, 85(5), 792-799. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.057>
- Raz, T., & Aharonson-Raz, K. (2012). Ovarian Follicular Dynamics During the Estrous Cycle in the Mare. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 67(1), 11-18.
- Roser, J. F., & Meyers-Brown, G. (2012). Superovulation in the Mare: A Work in Progress. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(7), 376-386. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.05.055>
- Santos, H. B., Thomé, R. G., Arantes, F. P., Sato, Y., Bazzoli, N., & Rizzo, E. (2008). Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in Prochilodus argenteus and Leporinus taeniatus (Teleostei: Characiformes). *Theriogenology*, 70(9), 1449-1460. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.091>
- Schäfer-Somi, S., Kowalewski, M. P., Kanca, H., Bozkurt, M. F., Gram, A., Sabitzer, S., . . . Aslan, S. (2015). GnRH and its receptor (GnRH-R) are expressed in the canine placenta and uterus. *Theriogenology*, 84(9), 1482-1489. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.034>
- Shukla, A. K. (2016). G Protein-Coupled Receptors (GPCRs). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 77, Part B, 183. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2016.05.008>
- Silva, E. S. M., Frade, S. C. F., Ignácio, F. S., Pantoja, J. C. F., Puoli Filho, J. N. P., & Meira, C. (2014). Supplementary corpora lutea monitoring allows progestin treatment interruption on day

- 70 of pregnancy in non-cyclic recipient mares. *Animal Reproduction Science*, 144(3–4), 122-128. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.12.004>
- Silva, J. R. V., Figueiredo, J. R., & van den Hurk, R. (2009). Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*, 71(8), 1193-1208. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.015>
- Smale, L., Heideman, P. D., & French, J. A. (2005). Behavioral neuroendocrinology in nontraditional species of mammals: Things the 'knockout' mouse CAN'T tell us. *Hormones and Behavior*, 48(4), 474-483. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.05.002>
- Spicer, L. J., Santiago, C. A., Davidson, T. R., Bridges, T. S., & Chamberlain, C. S. (2005). Follicular fluid concentrations of free insulin-like growth factor (IGF)-I during follicular development in mares. *Domestic Animal Endocrinology*, 29(4), 573-581. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.03.003>
- Stewart, W. R. A. a. F. (1993). Equine Chorionic Gonadotropin. In J. L. V. Angus O. McKinnon (Ed.), *Equine Reproduction* (pp. 81-96). Malvern, Pennsylvania, United States of America: Lea & Febiger.
- Veloz-Mochca, L. A. (2016). *Efecto de un antagonista de GnRH en la formación de folículos anovulatorios hemorrágicos en gestaciones equinas*. (Maestría en Ciencias), Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico.
- Watson, E. D., Pedersen, H. G., Thomson, S. R. M., & Fraser, H. M. (2000). Control of follicular development and luteal function in the mare: Effects of a GnRH antagonist. *Theriogenology*, 54(4), 599-609. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00375-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00375-7)
- Weltzien, F.-A., Hildahl, J., Hodne, K., Okubo, K., & Haug, T. M. (2014). Embryonic development of gonadotrope cells and gonadotropic hormones – Lessons from model fish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 385(1–2), 18-27. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.10.016>
- Zarco, L. C.-C., Sara. (2010). *Fisiología Veterinaria e Introducción a la fisiología de los procesos productivos* (S. d. C. C. C.-A. Villa-Godoy Ed. Primera Edición ed. Vol. 1). Ciudad de México: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO- DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA.

