



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD**  
**ANIMAL**

EFFECTO DEL DIA DEL CICLO ESTRAL Y LAS CONCENTRACIONES INICIALES DE  
PROGESTERONA SOBRE LA EFICIENCIA LUTEOLÍTICA DE DIFERENTES DOSIS DE  
CLOPROSTENOL SÓDICO EN OVINOS

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA**  
**SALUD ANIMAL**

**P R E S E N T A:**  
**LUZ MARIA GRANADOS VILLARREAL**

**TUTOR PRINCIPAL**

LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO, FMVZ – UNAM.

**COMITÉ TUTORAL:**

VICENTE OCTAVIO MEJIA VILLANUEVA, FMVZ – UNAM.

MARIA TERESA SANCHEZ TORRES ESQUEDA, COLPOS

CIUDAD UNIVERSITARIA CD. MX.

ENERO 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**DEDICATORIAS**

*A las personas que amo...*

*Mi esposo*

*Mis hijas*

*Mis padres*

*A mis hermanos*

*Por su comprensión, por su amor, por su ayuda y apoyo*

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) quien financió mis estudios.
- Al PAPIIT IN213915, de la Universidad Nacional Autónoma de México, quien financió el proyecto.
- A mi tutor Dr. Luis Alberto Zarco, por su invaluable apoyo y comprensión durante estos cuatro años. Por darme la oportunidad de aprender de Ud. Por brindarme su tiempo, por darme la libertad de trabajar a mi ritmo y expresar mis ideas.
- A mi comité tutorial, Dr. Octavio Mejía y Dra. Maria Teresa Sánchez, por su apoyo en la realización de la presente investigación.
- Al Dr. Jose Alfredo Medrano Hernández, miembro de mi jurado, por sus comentarios sobre esta tesis.
- A la Dra. Arantza por su apoyo, su comprensión y por sus valiosos aportes para la mejora de esta tesis.
- A la Dra. Lucía Rangel, por ser siempre un gran apoyo para mí y por su ayuda durante la realización de esta tesis.
- A las Dras. Clara Murcia y Susana Rojas por su ayuda durante el análisis hormonal.
- Al CEIEPO por el apoyo con las instalaciones y los animales para la realización del presente trabajo. A Angélica Gabriela Escobedo Jacobo, Esther Miguel de la Cruz y Érika Miguel Cruz, por su ayuda durante el trabajo experimental de campo.
- Al todos los que conforman el Departamento de Reproducción.

## RESUMEN

Se realizaron tres experimentos para determinar si existe variabilidad en la sensibilidad del cuerpo lúteo a la administración de cloprostenol en distintas etapas de la fase lútea, y si las concentraciones de progesterona presentes al momento de la administración de cloprostenol afectan la respuesta lútea a dicha administración. El primer experimento (capítulo 2) fue un estudio piloto para determinar las dosis a ser utilizadas en experimentos posteriores. Se trataron ovejas con una dosis alta (252  $\mu\text{g/mL}$ ), media (126  $\mu\text{g/mL}$ ) o baja (42  $\mu\text{g/mL}$ ) de cloprostenol en diversas etapas de la fase lútea. Todas las dosis evaluadas fueron efectivas para sincronizar el estró en diversas etapas de la fase lútea, por lo que se determinó que en experimentos posteriores encaminados a evaluar las causas de falla en la respuesta al cloprostenol se tendrían que evaluar dosis menores a las empleadas en el estudio piloto. En el segundo experimento (capítulo 3) se administraron dosis de 7.5, 12, 25 o 50  $\mu\text{g}$  de cloprostenol en el día 6 o 9 del ciclo estral y se determinaron las concentraciones de progesterona antes del tratamiento y a las 12, 24, 48 y 72 horas post-tratamiento. No hubo un efecto del día de administración sobre la eficiencia luteolítica de los tratamientos. En ambos días evaluados se encontró que con las dosis bajas la mayoría de las ovejas experimentaron una respuesta mínima al cloprostenol, con alteraciones menores en las concentraciones de progesterona. Con las dosis intermedias una proporción significativa de los animales sufrió una disminución marcada en las concentraciones de progesterona, que sin embargo fue seguida por recuperación de la función lútea, mientras que con la dosis de 50  $\mu\text{g}$  la mayoría de las ovejas experimentaron luteólisis completa. La dosis de 25  $\mu\text{g}$  tuvo cerca del 50 % de eficiencia luteolítica, por lo que en las ovejas tratadas con esa dosis se compararon las concentraciones iniciales de progesterona de las ovejas que experimentaron luteólisis completa con las de aquellas que sufrieron falla en la luteólisis, concluyéndose que la presencia de elevadas concentraciones de progesterona antes de aplicar el tratamiento con cloprostenol se asocia con una reducción en la sensibilidad lútea a la administración de dosis reducidas del compuesto. En el tercer experimento (capítulo 4) se realizaron determinaciones de progesterona en muestras obtenidas cada dos horas después de la administración de dosis reducidas de cloprostenol con el objeto de determinar el periodo crítico en el que se define el destino final del cuerpo lúteo (luteólisis completa o recuperación de la función), encontrándose que dicha definición ocurre entre 12 y 18 horas después de la administración del cloprostenol.

En esta tesis se concluye que las concentraciones elevadas de progesterona antes del tratamiento con cloprostenol están asociadas con una disminución en la sensibilidad del cuerpo lúteo a dosis reducidas

de cloprostenol, y que la definición del destino final del cuerpo lúteo ocurre entre 12 y 18 horas después de la administración del análogo de  $\text{PGF2}\alpha$ . Se discute la posibilidad de que las dosis reducidas de cloprostenol inicien un mecanismo de auto-amplificación mediante el cual la producción endógena de  $\text{PGF2}\alpha$  colaboraría para completar la luteólisis. La presencia de concentraciones elevadas de progesterona podría interferir con este mecanismo, lo que explicaría la mayor proporción de fallas luteolíticas en los animales con concentraciones de progesterona más elevadas al momento de ser tratadas con dosis reducidas de cloprostenol.

## **ABSTRACT**

Three experiments were conducted in order to assess if there is variability in luteal sensitivity to exogenous administration of cloprostenol at different stages of the luteal phase, and if the concentrations of progesterone at the time of treatment affect the luteal response to cloprostenol. The first experiment (chapter 2) was a pilot study aimed to determine the doses to be used in posterior experiments. Ewes were treated with either a high dose (252 µg/mL), a medium dose (126 µg/mL) or a low dose (42 µg/mL) of cloprostenol at different luteal stages. All the doses evaluated were effective to synchronize estrus at different stages of the luteal phase. Thus, it was determined that future experiments aiming to characterize cases of luteolytic failure would have to be done with smaller doses than those employed in the pilot study. In the second experiment (Chapter 3) 7.5, 12, 25 or 50 µg of cloprostenol were administered on either day 6 or day 9 of the estrous cycle, and progesterone concentrations were determined before the treatment and at 12, 24, 48 and 72 h after treatment. There was not an effect of day of treatment on the luteolytic efficiency of cloprostenol. After administration of the smallest dose most ewes only experienced a minimal response with minor alterations in progesterone concentrations. With intermediate doses a significant proportion of ewes showed a marked, but transient, depression in progesterone concentrations, which was followed by recovery of luteal function. Administration of 50 µg of cloprostenol caused complete luteolysis in most ewes. The luteolytic efficiency of 25 µg of cloprostenol was close to 50 %. Thus, the pre-treatment progesterone concentrations were compared between the ewes treated with 25 µg that experienced complete luteolysis and the ewes that suffered luteolytic failure after receiving the same dose, and it was found that the presence of high progesterone concentrations before the administration of small doses of cloprostenol was associated with reduced luteal sensitivity to such treatment. In the third experiment (chapter 4) progesterone concentrations were measured in blood samples obtained every 2 h after treatment with small doses of cloprostenol in order to determine the critical period during which the final luteal fate (complete luteolysis or function recovery) is defined. It was found that such definition occurs between 12 and 18 h after the administration of cloprostenol.

It is concluded that high progesterone concentrations are associated with a reduction in luteal sensitivity to low doses of cloprostenol, and that the final fate of the CL is defined between 12 and 18 h after administration of the PGF2 $\alpha$  analogue. The possibility that reduced doses of cloprostenol initiate a self-amplification mechanism involving endogenous PGF2 $\alpha$  production to complete luteolysis is discussed. The presence of high progesterone concentrations could interfere with this

mechanism, and this could explain the higher proportion of luteolytic failure in the ewes with higher progesterone concentrations at the time of treatment with reduced doses of cloprostenol.



## TRABAJOS GENERADOS DE ESTA TESIS

### ARTICULO EN REVISTA INDEXADA

Granados-Villarreal, L. M., Zarco, L., Mejía, O., Sánchez-Torres, M. T., Pablos-Hach, J. L. 2017. Luteolytic efficiency of reduced doses of cloprostenol in the ewe. Effect of progesterone concentrations at the time of treatment. Anim. Reprod. Sci. 186, 68-76.

### TRABAJOS EN CONGRESOS

- Granados V.L.M., Zarco L., Mejía V.O., Pablos J.L. 2015. “Factores que afectan el intervalo parto-estro de ovejas Suffolk amamantando durante la estación reproductiva”, XXXIX Congreso Nacional e Internacional de Buiatría “Luis Bravo Tornel”, 30 de julio al 1ro de agosto, 2015. Puebla, Puebla.
- Granados V.L.M., Zarco L., Mejía V.O., Pablos J.L. 2015. “Tratamiento de diferentes dosis de PGF2 $\alpha$  y etapas de la fase lútea sobre la respuesta estral en ovejas Suffolk”. XXXIX Congreso Nacional e Internacional de Buiatría “Luis Bravo Tornel” del 30 de julio al 1ro de agosto, 2015. Puebla, Puebla.
- Granados V.L.M., Zarco L., Mejía V.O., Pablos J.L. 2016. “Asociación de la raza y la edad con el comportamiento estral de las ovejas posterior a un tratamiento con PGF2 $\alpha$ ”, XL Aniversario del Congreso Nacional e Internacional de Buiatría, 4-16 de agosto de 2016. Zacatecas, Zacatecas.
- Granados V.L.M., Zarco L., Mejía V.O., Sánchez-Torres, M. T., Pablos J.L. 2016. “Niveles de progesterona antes del tratamiento de PGF2 $\alpha$  afectan la presentación de luteólisis en ovejas”. XXV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias (PANVET), 3-7 de octubre de 2016. Panamá, Rep. De Panamá.
- Granados V.L.M., Zarco L., Mejía V.O., Sánchez-Torres, M.T., Pablos J.L. 2017. “Patrones en las concentraciones de progesterona después del tratamiento con diferentes dosis de cloprostenol durante la etapa lútea temprana o media en la oveja”. XVIII Congreso Latinoamericano de Buiatría, 1-3 de noviembre de 2017. Medellín, Colombia.

## **DECLARACIÓN**

**La autora da el 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 intercambio bibliotecario.**

---

**Luz Maria Granados Villarreal**

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	13
CAPITULO 1 .....	17
REVISIÓN DE LITERATURA .....	17
1 EL CUERPO LÚTEO .....	18
1.1. Breve historia de la investigación acerca del cuerpo lúteo .....	18
1.2. Importancia del folículo que precede al cuerpo lúteo para su futura funcionalidad .....	19
1.3. Sistema vascular .....	20
1.4 Factores importantes para la vascularización folicular .....	21
1.5. Angiogénesis folicular .....	23
1.6. Influencia de los esteroides sobre angiogénesis folicular .....	24
1.7. Formación del cuerpo lúteo .....	24
1.8. Papel de la hormona luteinizante en los procesos vasculares de la luteinización .....	25
1.9. Modelo de vascularización del cuerpo lúteo.....	27
1.10. Flujo sanguíneo.....	28
2 MODELO DE LUTEOPROTECCIÓN DEL CUERPO LÚTEO BASADO EN LA PROGESTERONA .....	30
2.1. Generalidades de la síntesis de la progesterona.....	30
2.2 ¿De que dependen las concentraciones de progesterona?.....	31
2.3. Acciones de la progesterona .....	31
2.4. La PGE2, en apoyo a la luteoprotección.....	35
3 CARACTERIZANDO A LA PGF2 $\alpha$ .....	36
3.1. Línea de tiempo de la historia de la PGF2 $\alpha$ .....	36
3.2. Síntesis de la PGF2 $\alpha$ .....	38
3.3. ¿Qué factores y eventos estimulan la síntesis de la PGF2 $\alpha$ ? .....	39
3.4. El mecanismo a contracorriente de la PGF2 $\alpha$ .....	46
3.5. Modelo del mecanismo de acción de la PGF2 $\alpha$ .....	48
3.6. Sistema de autoamplificación .....	51
3.7 Metabolismo de la PGF2 $\alpha$ .....	53
4. EFECTOS DE LA PGF2 $\alpha$ : LUTEÓLISIS .....	54
4.1. Luteólisis funcional y estructural.....	54
CAPITULO 2 .....	76
RESPUESTA ESTRAL A DIFERENTES DOSIS DE CLOPROSTENOL EN DISTINTAS ETAPAS DE LA FASE LÚTEA EN OVEJAS SUFFOLK: ESTUDIO PILOTO .....	76
Introducción.....	76
Materiales y métodos.....	77

Resultados.....	77
Discusión .....	78
Conclusión.....	79
Referencias .....	79
CAPITULO 3.....	81
LA EFICIENCIA LUTEOLÍTICA DE DOSIS REDUCIDAS DE CLOPROSTENOL EN LA OVEJA. EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA AL MOMENTO DEL TRATAMIENTO. ....	81
CAPITULO 4.....	92
PERIODO CRÍTICO PARA COMPLETAR LA LUTEOLISIS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA DOSIS REDUCIDA DE CLOPROSTENOL EN LA OVEJA. ....	92
Introducción.....	92
Materiales y Métodos .....	94
Resultados.....	95
Discusión .....	97
Conclusiones.....	101
Referencias .....	101
CAPITULO 5.....	104
DISCUSIÓN GENERAL.....	104
Referencias .....	109

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento folicular y desarrollo del cuerpo lúteo.....	26
Figura 2. Síntesis de esteroides.....	32
Figura 3. Síntesis de prostaglandinas y tromboxanos.....	41
Figura 4. Síntesis de la PGF2 $\alpha$ a partir de otras prostaglandinas.....	42
Figura 5-Mecanismo de acción de la oxitocina.....	45
Figura 6. Mecanismo de a contracorriente de la PGF2 $\alpha$ .....	47
Figura 7. Mecanismo de acción de la PGF2 $\alpha$ .....	49
Figura 8. Mecanismo de autoamplificación de la PGF2 $\alpha$ .....	52
Figura 9. Mecanismo de apoptosis.....	59
Figura 10. Efectos de la PGF2 $\alpha$ a través de la vía intrínseca de apoptosis.....	60
Figura 11. Efectos agudos de la PGF2 $\alpha$ .....	65
Figura 12. Características intra pulso de las concentraciones de progesterona (P4), hormona luteinizante (LH) y el flujo sanguíneo (FS).....	67
Figura 13. Los efectos sugeridos de las acciones de la PGF2 $\alpha$ cuando se administra en diferentes etapas de la fase lútea.....	71

*“La ciencia no solo es compatible con la espiritualidad; es una profunda fuente de espiritualidad”*

*Carl Sagan*

## **INTRODUCCIÓN**

El descubrimiento de la prostaglandina F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α) durante el siglo pasado generó un gran interés en la comunidad científica. En un principio, esta hormona se estudió debido a su importancia biológica y posteriormente por sus efectos sobre el cuerpo lúteo (McCracken *et al.* 1970; Goding, 1974). La disminución en las concentraciones de la progesterona y la regresión estructural del cuerpo lúteo después de la administración de la PGF<sub>2</sub>α permitió explorar su uso para la sincronización del ciclo estral en los rumiantes (revisiones de Abecia *et al.* 2012, Amiridis y Cseh, 2012; Fierro *et al.* 2011). En los años 1970's se probaron varias vías de administración de la PGF<sub>2</sub>α, incluyendo la arteria uterina y la vena útero-ovárica (Thorburn y Nicol, 1971; Stacy *et al.* 1976). También se comparó la eficacia de la administración intramuscular con la infusión de la PGF<sub>2</sub>α dentro del lumen uterino (Douglas y Ginther, 1973). Pronto se comprobó que a pesar de que las vías de administración local permitían lograr la luteolisis con una dosis reducida de la PGF<sub>2</sub>α, éstas no eran prácticas. En consecuencia, comenzó a predominar la vía de administración intramuscular (Hackett y Robertson, 1980; Hoppe y Styler, 1989) y, a partir de entonces, se ha utilizado tanto para la PGF<sub>2</sub>α natural como para sus análogos sintéticos (Baird y Scaramuzzi, 1975; Hughes *et al.* 1976), lo que ha permitido un rápido avance en el desarrollo de métodos para la sincronización del estro.

El cloprostenol es un análogo sintético de la PGF<sub>2</sub>α que fue utilizado en la oveja a partir de 1975 (Baird y Scaramuzzi, 1975; Haresign y Acritopoulou, 1978; Acritopoulou y Haresign, 1980), y que es en la actualidad el análogo más empleado en esta especie (Abecia *et al.* 2011; Amiridis y Cseh, 2012; Fierro *et al.* 2013).

Más adelante, se demostró que tanto la PGF<sub>2</sub>α natural como el cloprostenol tienen efectos antiesteroideogénicos (McGuire *et al.* 1994; Juengel *et al.* 2000) y anti-angiogénicos directos en el cuerpo lúteo (Atli *et al.* 2012). Así, todas las ovejas que son tratadas con PGF<sub>2</sub>α o con sus análogos, aún en dosis reducidas, sufren una disminución en la producción de progesterona por el cuerpo lúteo, y por lo tanto en las concentraciones circulantes de dicha hormona. No obstante, en ocasiones esta disminución es transitoria, ya que el cuerpo lúteo se recupera y continúa produciendo progesterona (Trevisol *et al.* 2015).

La recuperación de la función lútea es más común cuando se utilizan dosis reducidas de la PGF<sub>2</sub>α o de sus análogos. Sin embargo, también se ha observado una variación individual en la eficiencia

luteolítica y en la respuesta estral de los animales después de la administración de una dosis estándar de la PGF2 $\alpha$  (Barrett *et al.* 2002; Abecia *et al.* 2012; Fierro *et al.* 2013). Algo de esta variación podría deberse a la etapa de la fase lútea en la cual se aplica el tratamiento, ya que se han observado variaciones en la respuesta a la utilización de una dosis determinada de PGF2 $\alpha$  o de sus análogos en diferentes momentos del diestro (Acritopoulou y Haresign, 1980; Hackett y Robertson, 1980). Herrera *et al.* (1990) y Hernández-Cerón *et al.* (2001) estudiaron en ovinos el efecto de la PGF2 $\alpha$  administrada ya sea entre los días 7 y 10 o entre los días 5 y 6 post ovulación, respectivamente. En ambos trabajos se encontró que aquellas ovejas que no completaron la luteolisis tenían concentraciones elevadas de progesterona antes de iniciar el tratamiento con PGF2 $\alpha$ , sugiriendo un posible efecto antiluteolítico o luteoprotector de la progesterona.

Diversos autores han descrito acciones antiluteolíticas y luteoprotectivas de la progesterona, que se manifiestan tanto por vías genómicas como no genómicas (Bishop y Stormshak, 2006; 2008; Grazzini *et al.* 1998). Estos efectos se han descrito en el ovino (Davis *et al.* 2010), el bovino (Bogacki *et al.* 2002; Okuda *et al.* 2004), el roedor (Goyeneche *et al.* 2003) y en el porcino (Diaz *et al.* 2011). Sin embargo, no existen trabajos publicados en los que se haya evaluado específicamente si las concentraciones elevadas de progesterona al comienzo del tratamiento con prostaglandinas afectan de manera negativa la presentación de la luteolisis completa.

Por otra parte, se han observado variaciones individuales en la respuesta a dosis pequeñas (subluteolíticas) de la PGF2 $\alpha$  (Juengel *et al.* 2000; Trevisol *et al.* 2015). En algunos animales no hay una alteración aparente en las concentraciones de progesterona después de la administración de una dosis reducida, lo que pudiera indicar una baja sensibilidad del cuerpo lúteo a esas dosis de la hormona. Hay también individuos, cuya sensibilidad del cuerpo lúteo a la PGF2 $\alpha$  se considera como moderada, que muestran una marcada, aunque transitoria, disminución en las concentraciones de progesterona después del tratamiento. Finalmente, otros animales, cuya sensibilidad es alta, presentan una luteólisis completa a pesar de que la dosis sea pequeña.

Los diferentes estados de maduración y sensibilidad lúteos tras la administración de prostaglandinas pudieran estar asociados también a las concentraciones de progesterona al momento del tratamiento. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue el de caracterizar la sensibilidad del cuerpo lúteo ovino a la administración de cloprostenol, así como el conocer la posible influencia de la etapa de la fase lútea y de las concentraciones de progesterona presentes antes de iniciar el tratamiento.

Para cumplir este objetivo se realizaron tres experimentos en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (CEIEPO) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), ubicado en el Estado de Morelos.

Debido a la variabilidad en las dosis y en los esquemas de administración de la PGF2 $\alpha$  o de sus análogos que se han utilizado en la gran cantidad de trabajos publicados sobre sincronización de estros en ovinos, se planteó un primer trabajo (Capítulo 2) como un estudio piloto encaminado a determinar las dosis más apropiadas para la realización de los trabajos siguientes. En el estudio piloto se evaluó la respuesta estral de ovejas Suffolk después de la administración de diferentes dosis de cloprostenol en diferentes etapas del ciclo estral. Para ello, las ovejas fueron tratadas con una dosis alta (252  $\mu\text{g}/\text{oveja}$ ), media (126  $\mu\text{g}/\text{oveja}$ ) o baja (42  $\mu\text{g}/\text{oveja}$ ) de cloprostenol sódico, administrada en las etapas temprana, media o tardía de la fase lútea (5-7, 8-10, 11-13 d). Los resultados del primer experimento demostraron que aún con la dosis más baja de cloprostenol se producía una alta respuesta estral al ser aplicada en las tres distintas etapas de la fase lútea, lo cual permitió determinar que en los siguientes experimentos deberían incluirse dosis aún más bajas del análogo, con el objeto de obtener una mayor frecuencia de falla en el tratamiento.

Adicionalmente, la elevada respuesta obtenida en el experimento piloto ante una dosis (42  $\mu\text{g}$ ) tradicionalmente considerada como baja, sugirió la posibilidad de que una dosis reducida de este análogo podría inducir la secreción de la PGF2 $\alpha$  endógena, lo que puede haber ayudado a completar la luteolisis.

El segundo experimento (Capítulo 3, “La eficiencia luteolítica de dosis reducidas de cloprostenol en la oveja. efecto de las concentraciones de progesterona al momento del tratamiento”) tuvo como objetivo comparar la eficiencia luteolítica del cloprostenol administrado en los días 6 o 9 de la fase lútea, incluyendo dosis mucho más bajas que las utilizadas en el experimento piloto (7.5  $\mu\text{g}$ , 12.5  $\mu\text{g}$ , 25  $\mu\text{g}$  y 50  $\mu\text{g}$ ), con el objeto de caracterizar la variabilidad en la respuesta a cada dosis e identificar una dosis que resultara en una eficiencia luteolítica cercana al 50 %, para poder evaluar si la respuesta a dicha dosis en términos de la eficiencia luteolítica se ve afectada por las concentraciones de progesterona presentes en el animal antes de aplicar el tratamiento.

Los resultados del segundo experimento demostraron que tanto en los animales en los que no se completa la luteólisis como en los que sufren luteólisis completa se produce una importante disminución en las concentraciones de progesterona en las primeras 12 horas después de la administración de cloprostenol. Esto ocurre independientemente de la dosis aplicada, de la etapa de la fase lútea en la que se administra el tratamiento o de las concentraciones iniciales de progesterona. Esta disminución se produce tanto en animales que posteriormente completarán la luteolisis como en aquellos en los que las concentraciones de progesterona se recuperarán después de una disminución transitoria. Durante la luteolisis natural, se conoce que después de los primeros pulsos de secreción de la PGF2 $\alpha$



generalmente se induce una disminución en las concentraciones de progesterona. No obstante, son la frecuencia y el número de pulsos posteriores (durante las siguientes 30 horas) lo que determina el momento en el que se completará la luteolisis (Zarco *et al.* 1988) o si el cuerpo lúteo se recuperará y se producirá una persistencia lútea (Zarco *et al.* 1984). Lo anterior sugiere que es posible que exista un período crítico en el cual se decide si un cuerpo lúteo está destinado a recuperarse o a sufrir luteolisis completa. Dicho periodo debe encontrarse en algún momento entre las 12 y las 30 horas a partir de la primera exposición del cuerpo lúteo a la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  o sus análogos. Para probar esto último, se planteó el tercer experimento (Capítulo 4), el cual tuvo como objetivo evaluar la respuesta inicial del cuerpo lúteo durante las primeras 24 horas posteriores a la administración de una dosis elevada con alta efectividad luteolítica (250  $\mu$ g) o una dosis reducida con muy baja efectividad (10  $\mu$ g) de cloprostenol. Un segundo objetivo del tercer experimento fue caracterizar el período crítico (definido como el momento en el que se produce una diferencia en las concentraciones de progesterona entre los grupos); y determinar la velocidad con la que se produce la reducción inicial en las concentraciones de progesterona de acuerdo con la dosis administrada.

*“La ciencia no es perfecta, con frecuencia se utiliza mal, no es más que una herramienta, pero es la mejor herramienta que tenemos, se corrige a sí misma, está siempre evolucionando y se puede aplicar a todo. Con esta herramienta conquistamos lo imposible”*

**Carl Sagan**

## **CAPITULO 1**

### **REVISIÓN DE LITERATURA**

Imagine que está jugando un partido de ajedrez. Es un hecho que dependiendo de la pieza que se mueva, se generarán posibles movimientos de respuesta. Este hecho aparentemente obvio, podría compararse con la luteólisis. Sólo el 1% de la PGF2 $\alpha$  sintetizada y secretada por el endometrio llegará al cuerpo lúteo (McCracken *et al.* 1999) y se unirá a su receptor, a partir de lo cual se generarán un número de posibles pasos posteriores.

Durante años se pensó que después de la administración de una dosis luteolítica de la PGF2 $\alpha$  el cuerpo lúteo inevitablemente sufriría regresión. Con el tiempo se hizo patente que, si bien puede observarse una disminución en las concentraciones de progesterona, algunas veces éstas se recuperan sin que se complete la luteólisis (Ginther *et al.* 2007; Shrestha *et al.* 2010; Ginther y Beg, 2012 a y b; Trevisol *et al.* 2015). Más aún, Kobayashi *et al.* (2001a) reportaron que la inyección de una dosis luteolítica de la PGF2 $\alpha$  antes del día 5 después del estro no induce luteólisis. Sin embargo, algunos años después se demostró que la administración de la PGF2 $\alpha$  puede ser efectiva desde el día 3 del ciclo estral (Rubianes *et al.* 2003; Pope y Cárdenas 2004). Por lo tanto, se pueden obtener diferentes resultados después de un tratamiento con PGF2 $\alpha$  natural o alguno de sus análogos, como la ausencia de la respuesta del cuerpo lúteo, la disminución transitoria en las concentraciones de progesterona o bien, la luteólisis completa que culmina con la destrucción definitiva del cuerpo lúteo.

A partir de estos hechos se generan varias preguntas, ¿Por qué esta variabilidad en la respuesta del cuerpo lúteo a la PGF2 $\alpha$ ? ¿De qué depende que se complete la acción de la PGF2 $\alpha$  en el cuerpo lúteo? ¿Existe “resistencia” intrínseca o “protección” del cuerpo lúteo contra la luteólisis? ¿Qué características tiene el cuerpo lúteo que es resistente a la PGF2 $\alpha$ ?

Para intentar comprender las diferentes respuestas que el cuerpo lúteo es capaz de emprender ante la presencia de la PGF2 $\alpha$ , se debe estudiar desde sus muchas facetas. La primera es entender que, a pesar de su naturaleza efímera, el cuerpo lúteo domina el periodo más largo del ciclo estral, la “fase lútea”. Durante toda la vida del cuerpo lúteo se producen cambios endócrinos, así como reorganizaciones en su estructura. Estos cambios son los que definen cada etapa de su desarrollo:

formación, mantenimiento y regresión. Además, se debe considerar la presencia o ausencia de factores anti-luteolíticos y pro-luteolíticos que residen en el mismo cuerpo lúteo bajo un delicado y perfecto equilibrio. Es notable que los factores generados en esta pequeña glándula sean capaces no solo de transformarla funcional y estructuralmente, sino también de impactar de manera autocrina, parácrina y endócrina a otros tipos celulares.

## **1 EL CUERPO LÚTEO**

### ***1.1. Breve historia de la investigación acerca del cuerpo lúteo***

A pesar de que Vesalious, en 1561, describió los ovarios, oviducto y cuerpo lúteo (Kleine y Rossmanith 2016); Fabrizio, Girolamo fue el primero en realizar, en el año 1600, una comparación anatómica ilustrada en sus publicaciones “De formato foetu” y “De formatione ovi et pulli” (Stouffer, 2006). El nombre de “cuerpo lúteo” fue usado posteriormente por Marcello Malpighi, posterior a las observaciones de Regnier de Graff (Meidan, 2017). quien lo llamó “globular body” (Stouffer, 2006). El mismo autor hace mención de Allen y Wintersteiner en 1934, en su artículo “Crystalline progestin”, en el que dichos investigadores mostraron que la proliferación de la mucosa uterina era inducida por una hormona producida por el cuerpo lúteo. La llamaron “progestina”, por depender de ella la implantación y desarrollo del embrión. En 1933, Fevold *et al.* (1933), reportaron que el desarrollo de los folículos y del cuerpo lúteo de los ovarios de las ratas y conejos se debe a la acción de dos principios separados. Uno de los ellos causa crecimiento de los folículos, y el segundo, transforma a los folículos en cuerpos lúteos. En 1934, diferentes laboratorios indicaron el aislamiento de 3 diferentes compuestos a partir del cuerpo lúteo, siendo la progestina la hormona principal. Desde entonces, el estudio del cuerpo lúteo se ha incrementado. La importancia fisiológica de esta glándula se refleja en la intensidad con la cual ha sido investigada a lo largo de los años. Por ejemplo, la base de datos de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos de Norteamérica (PubMed), arroja al menos 14,805 artículos relacionados con el cuerpo lúteo desde 1920 a 2017 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), mientras que Google académico arroja 56,100 resultados en el mismo período:

[https://scholar.google.es/scholar?q=corpus+luteum&hl=es&as\\_sdt=0%2C5&as\\_ylo=1920&as\\_yhi=2017](https://scholar.google.es/scholar?q=corpus+luteum&hl=es&as_sdt=0%2C5&as_ylo=1920&as_yhi=2017)). Stouffer (2006) encontró 3,000 artículos sobre el cuerpo lúteo por década desde 1970. Si acortamos el tiempo de búsqueda desde 1970, existen 13,258 resultados en PubMed y 38,200 resultados en Google académico. Esto indica que a partir de esta década el estudio acerca del cuerpo lúteo ha aumentado extraordinariamente. Esto tiene mucho que ver, probablemente, con el uso de

distintas técnicas de biología molecular que permitieron ahondar más en el conocimiento de esta glándula.

### ***1.2. Importancia del folículo que precede al cuerpo lúteo para su futura funcionalidad***

El cuerpo lúteo, la fuente principal de progesterona durante el ciclo estral, se desarrolla principalmente a partir de la luteinización de células foliculares bajo el estímulo de la LH (Niswender *et al.* 2000). El cuerpo lúteo es uno de los tejidos más irrigados del organismo, por lo que su formación, que ocurre en unos cuantos días, requiere de una bien regulada angiogénesis.

La transición de folículo a cuerpo lúteo representa un período de intensa angiogénesis, cuyo resultado final es una eficiente perfusión (Laird *et al.* 2013). Este periodo de intensa angiogénesis se inicia con la ovulación del folículo y perdura hasta que el cuerpo alcanza su máximo nivel de funcionamiento. Es posible entonces que la calidad de la vascularidad que se desarrolle en el folículo pueda afectar el flujo sanguíneo del cuerpo lúteo y, como consecuencia, la producción de progesterona. De hecho, en cualquier momento del ciclo, el ovario posee muchos folículos en diferente estado de desarrollo y algunos en atresia. El índice de crecimiento de los folículos, así como su habilidad para convertirse en folículos dominantes, dependen del incremento en el flujo sanguíneo (Acosta *et al.* 2005). Recientemente, se confirmó que las dimensiones del folículo preovulatorio y del cuerpo lúteo se correlacionan con el flujo sanguíneo y con las concentraciones sistémicas de progesterona producidas por el cuerpo lúteo resultante (de Tarso *et al.* 2017). También existe una correlación positiva entre el peso del cuerpo lúteo y las concentraciones de progesterona periféricas en vacas cíclicas (Bartol *et al.* 1981). Esto indica que el folículo es la base del futuro cuerpo lúteo y de la producción de la progesterona. Es importante considerar que el crecimiento folicular depende de la irrigación sanguínea, pero también supone condiciones de hipoxia. La estimulación gonadotrópica permite el crecimiento folicular, sin embargo, en el estrato mural granuloso, por ejemplo, no hay presencia de vasculatura, por lo que se puede crear un ambiente local hipóxico dentro del folículo preovulatorio (Kim *et al.* 2009). De hecho, antes del pico de la LH solamente se detecta flujo sanguíneo en una pequeña área en la base del folículo (Acosta *et al.* 2003). A partir del pico de la LH se inicia la creación de una red vascular que proporcionará el flujo de nutrientes y hormonas que promoverán el crecimiento y la formación del cuerpo lúteo. Aquellos folículos que están bien vascularizados ovulan y se desarrollan hasta convertirse en un cuerpo lúteo (Acosta *et al.* 2003), mientras que los folículos atresícos se caracterizan por una disminución en la vascularidad, ausencia de flujo sanguíneo detectable, y una disminución progresiva de su diámetro (Acosta *et al.* 2005).

### ***1.3. Sistema vascular***

El sistema vascular en general se desarrolla a través de dos procesos: vasculogénesis y angiogénesis. El primero se refiere a la diferenciación *in situ* (Patan, 2000) del plexo vascular, formado desde el mesodermo por diferenciación de células progenitoras endoteliales (angioblastos) (Risau *et al.* 1988), generando vasos sanguíneos primitivos durante el desarrollo embrionario (Risau, 1997). Es a partir de la formación de este plexo primario vascular que se forman nuevos vasos sanguíneos (Amselgruber *et al.* 1999; Gerhardt y Betsholtz 2003), durante el segundo proceso conocido como angiogénesis. La angiogénesis es responsable de la remodelación y de la expansión de las redes vasculares (Patan, 2000) y transita por los siguientes pasos: 1) La fragmentación de la lámina basal de los vasos existentes, 2) la migración de células endoteliales desde los vasos existentes hacia el estímulo angiogénico y 3) la proliferación de células endoteliales (Folkman y Klagsbrun, 1987).

Pepper (2001) describe el proceso de la angiogénesis en dos fases: Activación y resolución. La fase de activación se basa en la proliferación y migración de células endoteliales, las cuales revisten internamente a la vasculatura y están asociadas con células murales, como los pericitos y células del músculo liso vascular. Esta activación depende de la matriz extracelular, la cual modula la proliferación, diferenciación y función celular (Smith *et al.* 2002). La matriz extracelular está constituida por macromoléculas que pertenecen a uno de cuatro grandes sistemas: colágeno, elástico, proteoglicanos y glucoproteínas de adhesión (Silvera y Barrios 2012), y representa una barrera para la migración celular (Smith *et al.* 1999). La matriz extracelular también tiene utilidad como reservorio para factores de crecimiento (Smith *et al.* 2002). Como durante esta primera fase se requiere la proliferación y migración de las células endoteliales, así como la formación del lumen del nuevo vaso sanguíneo, la membrana basal debe disolverse (Kalebic *et al.* 1983; Vu y Werb 2000; Hughes, 2008). La degradación de la matriz extracelular se lleva a cabo por unas enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y Zinc (Vu y Werb, 2000) llamadas metaloproteinasas (MMP) (Smith *et al.* 2002). La familia de MMP tiene al menos 20 miembros, incluyendo las colagenasas-1 (MMP-1, -8, -13 y -18), las gelatinasas A (MMP-2) y B (MMP-9), y las estromelinas 1 (MMP-3), -2 (MMP-10) (Smith *et al.* 1999). Los factores de crecimiento se liberan al degradarse la matriz extracelular por la acción de las metaloproteinasas (Smith *et al.* 1999), o por la actividad de alguna proteína acarreadora (Powers *et al.* 2000). Una vez fragmentada la matriz extracelular, las células endoteliales migran, proliferan y, una vez conectadas y alineadas, forman el lumen del vaso sanguíneo.

Una vez que inicia la fase de resolución se inhibe la proliferación de las células endoteliales y cesa la migración celular, por lo que se restituye la membrana basal y se ensambla la pared del vaso. Durante esta segunda fase, los vasos formados se estabilizan por el reclutamiento de los pericitos, permitiendo

la maduración funcional del endotelio (Risau, 1997; Pepper, 2001). Los pericitos son células perivasculares que tienen la capacidad de diferenciarse en otros tipos de células mesenquimales, incluyendo células del músculo liso, fibroblastos y osteoblastos (Gerhardt y Betsholtz, 2003). Además, rodean los microvasos de nueva formación (Amselgruber *et al.* 1999), haciendo contacto íntimo con las células endoteliales. Es posible que este tipo celular pueda tener una función como estructuras de guía, ayudando a la proliferación de las células endoteliales en el cuerpo lúteo bovino (Amselgruber *et al.* 1999).

#### ***1.4 Factores importantes para la vascularización folicular***

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) es producido por el endodermo durante el desarrollo de los vasos sanguíneos y tanto el VEGF como su receptor se expresan en los angioblastos. En los folículos pequeños, la producción del VEGF y de sus isoformas (VEGF120 y 164) (Shimizu y Miyamoto, 2007), comienza en las células de la granulosa antes de la formación del antro. El VEGF mejora la permeabilidad vascular y crea las condiciones para el desarrollo del mismo y para los eventos futuros de ovulación (Tamanini y De Ambrogi, 2004). La expresión y acción del VEGF es necesaria en todos los estados de desarrollo folicular, debido a que inicia la angiogénesis (Robinson *et al.* 2009). El VEGF actúa como morfogen para las células endoteliales y es un quimio-atrayente de fibroblastos y de las células endoteliales circulantes (Hughes, 2008). Además, el VEGF es un mitógeno específico para las células del endotelio vascular y capaz de estimular la angiogénesis *in vivo* (Houck *et al.* 1991), ya que induce el brote de capilares (Koblizek *et al.* 1998). El VEGF realiza su función a través de la interacción con sus receptores de alta afinidad de tipo tirosina cinasa (flk-1 yflt-1) (Matthews *et al.* 1991; de Vries *et al.* 1992; Millauer *et al.* 1993). Sin embargo, aunque la expresión del VEGF, flk-1 yflt-1 se ha relacionado con la angiogénesis, no parecen ser suficientes para iniciarla (Li *et al.* 1996).

Otros factores de crecimiento importantes en este proceso son los factores de crecimiento de los fibroblastos (FGF), tanto el ácido (FGF-1a) como el básico (FGF-2b). Ambos son miembros de una gran familia de 25 proteínas (Berisha *et al.* 2016). Se trata de pequeños polipéptidos que comparten características estructurales y que son secretados dentro de la matriz extracelular, donde se unen a glicosaminoglicanos semejantes a la heparina (Powers *et al.* 2000). El FGF-2 tienen cuatro isoformas que se localizan en el núcleo o en el nucléolo (Arese *et al.* 1999). Los efectos biológicos del FGF son mediados por receptores de alta afinidad de tipo tirosina cinasa (FGFR-1 al -4) ((Schams y Berisha 2002; Berisha *et al.* 2016). Los fibroblastos se activan en respuesta a una herida, o bien debido al crecimiento de un tumor (Powers *et al.* 2000; Hughes, 2008). Una vez liberados por la degradación

de la matriz extracelular, los FGF pueden actuar directamente sobre las células vasculares endoteliales regulando su activación y proliferación de las mismas (Folkman y Klagsbrun, 1987; Arese *et al.* 1999) a través de la expresión de sindecanas (Hughes, 2008). Éstas son componentes de la membrana cuya actividad se requiere para la adhesión focal (Woods *et al.* 2000). Asimismo, el FGF-2 acelera el proceso de transición de las células endoteliales no desarrolladas hacia la formación de redes organizadas de múltiples ramas (Laird *et al.* 2013). Aunque los varios miembros de la familia de factores de crecimiento del fibroblasto son generalmente mitóticos, un miembro en particular, el FGF-18, es pro-apoptótico en las células de la granulosa *in vivo* (Portela *et al.* 2015).

Ingman y Robertson (2002) describieron a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ), la cual consiste en más de 30 proteínas con 30-80% de homología en su secuencia. Los miembros mejor caracterizados son las cinco isoformas del TGF $\beta$ , de los cuales los TGF $\beta$ -1, -2 y -3 se expresan en mamíferos (Ingman y Robertson, 2002). Los TGF $\beta$  se activan y envían señales para bloquear la proliferación de las células endoteliales y pericitos (Hughes, 2008). En general, el TGF $\beta$  es un factor de crecimiento capaz de estimular o inhibir la angiogénesis (Pardali y ten Dijke, 2009). El factor de necrosis tumoral alfa (por sus siglas en inglés, TNF $\alpha$ ) puede estimular la secreción de VEGF (Schams *et al.* 2001). El TGF $\beta$  puede bloquear la proliferación de células endoteliales y pericitos (Hughes, 2008).

Por otro lado, la angiopoietina-1 está implicada en los procesos de desarrollo de las células endoteliales y en los mecanismos de vascularización. La angiopoietina-1 se une a su ligando: TIE2, un receptor de tipo tirosina cinasa que se expresa en células endoteliales y en células hematopoyéticas. La angiopoietina-1 se requiere para el desarrollo de las estructuras vasculares durante la embriogénesis (Davis *et al.* 1996). Mientras la angiopoietina-1 obligadamente activa su receptor e induce la fosforilación del Tie2, la angiopoietina-2 puede activar Tie2 en algunas células endoteliales cultivadas y bloquear su activación en otras (Gale *et al.* 2002). La angiopoietina-2 es débilmente mitogénica para las células endoteliales (Koblizek *et al.* 1998), pero es un requisito para la angiogénesis (Gale *et al.* 2002). Tanto el VEGF como el sistema de péptidos vasoactivos Ang-Tie (Ang-1 y -2, Tie-1 y -2), se expresan en células de la granulosa y en células de la teca. Sin embargo, se observan mayores niveles de expresión en células de la teca, los cuales se relacionan con el estado del ciclo estral y el tamaño del folículo (Chowdhury *et al.* 2010).

En el mamífero, los eventos cíclicos de folículo a cuerpo lúteo pueden ser regulados por comunicación célula-célula. El sistema de proteínas Notch está involucrado en la señalización juxtácrina y es importante para los procesos de desarrollo, incluyendo la vasculogénesis y la producción de esteroides (Vanormy y Mayo, 2017). Igualmente, las Notch podrían regular el crecimiento y la

producción de estradiol de las células de la granulosa *in vitro* (Jing *et al.* 2017), así como la proliferación de las células de la granulosa (Zhang *et al.* 2011). La vía de señalización de las Notch regula decisiones de destino celular, modulando la diferenciación y la supervivencia de las células (Vorontchikhina *et al.* 2005). Los componentes de las Notch se expresan diferencialmente en la matriz extracelular durante el desarrollo del folículo y del cuerpo lúteo (Murta *et al.* 2015). Durante el desarrollo folicular, las Notch se expresan en células de la granulosa del ratón (Johnson *et al.* 2001), en células de la teca de folículos pre-antrales (Murta *et al.* 2015), en folículos antrales en el ovino (Jing *et al.* 2017) y en ovocitos de los folículos en cualquier estado de desarrollo.

El óxido nítrico (ON) es una molécula sintetizada por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS, por sus siglas en inglés) en las células endoteliales a partir del aminoácido L-Arginina, que actúa como donador de nitrógeno (Moncada *et al.* 1991). A partir de una comunicación parácrina, el ON estimula la producción perivascular del VEGF, el cual, a su vez, estimula la expresión endotelial de la eNOS (Reynolds *et al.* (2000). Además, el ON regula la disponibilidad del O<sub>2</sub>. En el caso de hipoxia, éste actúa como un estímulo para la producción del VEGF, el cual ampliará la densidad y la permeabilidad de los vasos sanguíneos que rodean al folículo preovulatorio, favoreciendo la llegada del estímulo hormonal cuando se produzca el pico de la LH. La NOS existe en tres isoformas: neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS). Las NOS son responsables de la liberación basal continua del ON (Rosselli *et al.* 1998). Entre las funciones del ON se pueden mencionar la inhibición de la agregación plaquetaria, la proliferación de las células del músculo liso, la regulación de la muerte celular programada y el mantenimiento de la función de las células endoteliales como barrera. La activación y síntesis del ON se produce por un incremento en Ca<sup>2+</sup> intracelular, sin embargo, la iNOS es independiente de este ión (Rosselli *et al.* 1998). El ON se induce después de la activación de los macrófagos, en las células endoteliales y en otras células por intermediación de las citocinas (Moncada *et al.* 1991).

### ***1.5. Angiogénesis folicular***

Durante la fase lútea, el desarrollo folicular se mejora por la secreción basal de pulsos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Rawlings *et al.* 2003), la cual provoca la secreción de las gonadotropinas (Smith, 2009). Dichas hormonas actúan como factores angiogénicos específicos al tejido blanco y pueden modular el sistema vascular de los órganos reproductivos.

La angiogénesis es un proceso clave para el crecimiento folicular y para el desarrollo lúteo. La selección de un folículo dominante depende del adecuado desarrollo de una red vascular en dicho folículo, probablemente controlada por una mayor expresión del VEGF y de la eNOS. El VEGF actúa



para inducir la proliferación de células de la granulosa del bovino en folículos de 4-8 mm y para mejorar el efecto de la hormona folículo estimulante (FSH) sobre esta proliferación celular (Doyle *et al.* 2010). Además, el flujo sanguíneo aumenta aproximadamente 55 % durante la fase folicular debido, al menos en parte, a la producción *de novo* del ON (Gibson *et al.* 2004).

Por otro lado, el 17 $\beta$ -estradiol puede regular los procesos angiogénicos, ya que un folículo que produce dicho esteroide es “activo” y potencialmente dominante y es diferente de un folículo inactivo (potencialmente no dominante) en la expresión del VEGF, la eNOS, y en el índice de proliferación de las células de la granulosa y de la teca (Grazul-Bilska *et al.* 2007). Asimismo, el ON muestra una correlación positiva con los estrógenos, ya que incrementan concomitantemente con el diámetro del folículo ovulatorio y alcanzan un máximo nivel al momento de la ovulación (El-Sherry *et al.* 2013).

En los folículos atresicos, en cambio, la expresión de la eNOS está ausente o reducida (Grazul-Bilska *et al.* 2006). Por otro lado, a pesar de que el tamaño del folículo no afecta la cantidad de ARN mensajero (ARNm) para el VEGF, se observó una disminución en las concentraciones de dicho factor en los folículos atrésicos (Rosales-Torres *et al.* 2010).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, es posible suponer que tanto el VEGF, como el FGF y el sistema Notch, están involucrados en regular tanto a las células foliculares como a las lúteas, por lo que se podría asumir que son factores importantes para el proceso de transición de folículo a cuerpo lúteo.

### ***1.6. Influencia de los esteroides sobre angiogénesis folicular***

Los patrones de expresión de las isoformas del VEGF durante el desarrollo folicular son dependientes de hormonas como la progesterona, que puede estimular la expresión del VEGF 120 en células de la granulosa del bovino (Laird *et al.* 2013; Shimizu y Miyamoto, 2007).

En el caso de los estrógenos, el 17 $\beta$ -estradiol puede tener un papel en la regulación de la expresión del gen ET-1 y su producción en las células endoteliales (Bilsel *et al.* 2000), y lo hace inhibiendo la expresión del gen y la secreción del péptido de ET-1 (Akishita *et al.* 1998), e incrementando ON (Bilsel *et al.* 2000).

### ***1.7. Formación del cuerpo lúteo***

La longitud del ciclo estral de la oveja es de 15 a 18 días (d), (Ortman, 2000; Roberts *et al.* 1985; Zarco *et al.* 1988a), lo que depende principalmente del momento en el cual se inicia la luteólisis

(Zarco *et al.* 1988a). Después de la ovulación, y en respuesta a la estimulación por hormonas luteotrópicas como la hormona luteinizante (LH), las células foliculares se transforman en células lúteas, las cuales empiezan a sintetizar progesterona. Las concentraciones circulantes de esta última hormona se comienzan a incrementar de manera gradual al mismo tiempo que está ocurriendo el desarrollo estructural del cuerpo lúteo. En el ovino es posible dividir la fase lútea en tres etapas: Fase lútea temprana (días 3 a 6), fase lútea media (días 7 a 10) y fase lútea tardía (días 11 a 15). La división de la fase lútea en estas etapas se basa en el grado de madurez y funcionalidad del cuerpo lúteo. La primera etapa corresponde al periodo durante el cual se desarrolla el CL, la segunda representa la funcionalidad plena del CL (concentraciones plasmáticas de P4 mayores a 1 ng/ml) y la última coincide con el inicio y desarrollo de la luteólisis. Los eventos referidos se representan en la figura 1.

### ***1.8. Papel de la hormona luteinizante en los procesos vasculares de la luteinización***

La LH es la hormona que inicia el proceso de formación del cuerpo lúteo, incluyendo la activación de los mecanismos de vascularización y la modulación del flujo sanguíneo. La administración de LH a folículos preovulatorios en el bovino provocó un incremento en la secreción de estradiol-17 $\beta$ , androstenediona, progesterona, prostaglandinas y endotelina 1 (ET-1) por las células de la teca de folículos maduros (Acosta *et al.* 1998). De la misma manera, se ha reportado un efecto sobre el flujo sanguíneo. Niswender *et al.* (1976) reportaron en ovejas que el flujo sanguíneo se elevó en forma significativa en respuesta a la LH. Acosta *et al.* (2003) observaron un agudo incremento en la velocidad del flujo sanguíneo en el folículo preovulatorio 0.5 horas después de la inyección de la GnRH, en sincronía con el inicio del pico preovulatorio de la LH. Dicho aumento en las concentraciones de la LH provocó un incremento en las concentraciones de estradiol (Acosta *et al.* 2003). Además, de manera indirecta, la LH puede regular el flujo sanguíneo. El ARNm para la eNOS se observó en células de granulosa a las 12 y 24 horas, y en las células de la teca a las 48 horas después de la inyección de hCG en ovinos (Grazul-Bilska *et al.* 2006).

La LH estimula a los factores angiogénicos, como el VEGF, en las células foliculares y células lúteas del bovino (Schams *et al.* 2001). Según Laird *et al.* (2013), el VEGF y el FGF trabajan de manera sinérgica, pero con papeles diferentes. Por un lado, el VEGFR2 promueve la proliferación de las células endoteliales, estimulando el número y el tamaño de las mismas. El FGFR, sin embargo, induce la ramificación y la elongación de las células endoteliales (el brote). Asimismo, la LH estimula la acumulación de ARNm para MMP-1, MMP-9 y para el inhibidor de MMP: TIMP-1; que se encuentran e incrementan únicamente después de la ovulación (Berisha *et al.* 2008). Las metaloproteínas y sus inhibidores son importantes por su acción en la remodelación de tejidos, lo cual

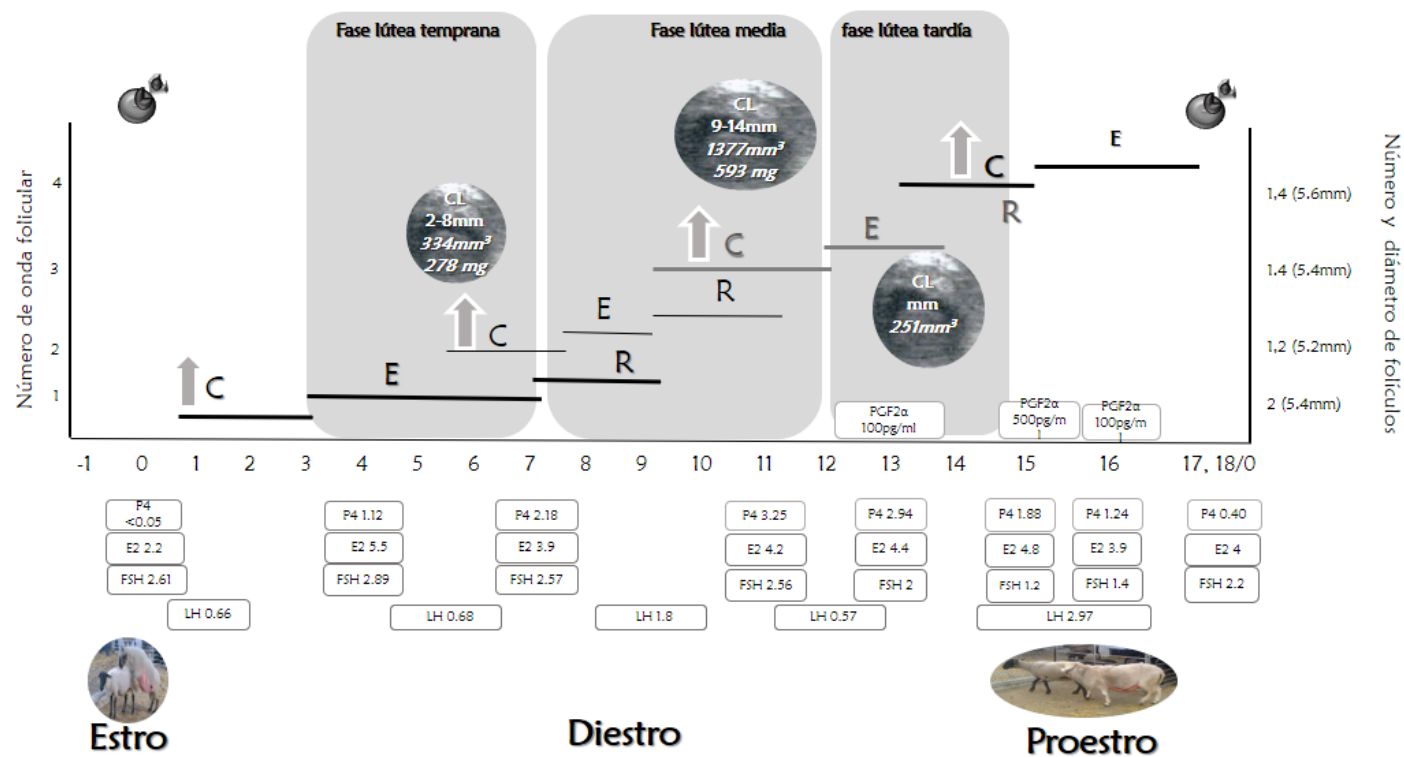


Figura 1. Crecimiento folicular y desarrollo del cuerpo lúteo. En el ovario del ovino durante el diestro, se llevan a cabo dos procesos simultáneos. Por un lado, el crecimiento folicular y, por el otro, el desarrollo del cuerpo lúteo (CL). Durante el ciclo estral se presentan entre 3 y 4 ondas de crecimiento folicular, con variación en el número y tamaño de los folículos. Cada onda se caracteriza por 1-4 folículos alcanzando un estado final de desarrollo, de los cuales los folículos antrales ya sea de la penúltima onda o de la onda final del ciclo ovulan (C: crecimiento, E: estático, R: regresión). Las flechas indican el incremento de la hormona folículo estimulante (FSH), (ng/ml) que es un incremento transitorio que se presenta al inicio de la emergencia de cada onda folicular, y del estradiol (E2), (pg/ml). El día de la ovulación es representado por el día cero. Se representan las concentraciones promedio de progesterona (P4), (ng/ml), hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), (ng/ml) y prostaglandina F2α (PGF2α), (ng/ml) a lo largo del ciclo estral. El tamaño (mm), volumen (mm<sup>3</sup>) y el peso (mg) del cuerpo lúteo cambia a lo largo del ciclo estral de la oveja. Basado en Bartlewski *et al.* 1999a; 1999b; Juengel *et al.* 2000; Hernández-Cerón *et al.* 2004; Uribe-Vazquez *et al.* 2010; Baby y Bartlewski, 2011; Zarco, *et al.* 1988a,b.

es importante para el proceso de ovulación estimulado por LH. Debido a que el colágeno en el estrato tecal, así como en la membrana basal del folículo, contribuye a la resistencia de la pared folicular, se observa una máxima actividad colagenolítica durante el tiempo de la ruptura folicular en el ovino (Murdoch *et al.* 1986). La región del ápice de la pared folicular está compuesta de células de la granulosa, membrana basal, células de la teca, túnica albugínea y el epitelio superficial, con su membrana basal subyacente (Smith *et al.* 1999). La degradación proteolítica de la matriz extracelular se produce debido a que la membrana basal se disuelve. Cuando la matriz extracelular se destruye inicia el proceso de angiogénesis a partir de la vasculatura tecal preexistente (Acosta *et al.* 2003). Recapitulando, la LH produce, por un lado, la ovulación y por el otro, estimula la angiogénesis a través de la estimulación del VEGF, así como la pérdida de la membrana basal por la acción de las MMP's. Para el momento de la ovulación, las concentraciones de estrógenos y el ON incrementan concomitantemente con el diámetro del folículo ovulatorio, alcanzando su máximo nivel (El-Sherry *et al.* 2013). Sin embargo, es la ET-2 la sustancia que finalmente provoca la ruptura folicular por constricción de los vasos de los folículos periovulatorios (Ko *et al.* 2006).

### ***1.9. Modelo de vascularización del cuerpo lúteo***

Después de la ovulación, el cuerpo lúteo crece y se vasculariza en forma extremadamente rápida conforme se forma a partir de las células que constituyen la pared del folículo. En efecto, los índices de crecimiento tisular y de angiogénesis en el cuerpo lúteo rivalizan con los de los tumores de crecimiento más rápido (Reynolds *et al.* 2000), capaces de crecer a un ritmo de hasta 1 mm por día (Folkman, 1971).

El proceso de vascularización que se inicia antes de completarse la ovulación continúa durante la etapa lútea. En el cuadro 1 se observa el cambio en la intensidad de expresión de diversos factores angiogénicos y vasoconstrictores, en distintas etapas de la fase lútea. La vascularidad lútea incrementa gradualmente desde la etapa lútea temprana a la media, mientras que disminuye durante la fase lútea tardía (Zheng *et al.* 1993).

Durante el período post-ovulatorio inmediato, dos procesos relativos a la formación de los vasos sanguíneos ocurren de manera simultánea: la comunicación celular se realiza mediante uniones gap entre las células del parénquima y las células endoteliales, lo que hace posible coordinar su crecimiento y desarrollo (Redmer y Reynolds, 1996). Muy poco tiempo después de la ovulación, los pericitos derivados del compartimento tecal son las primeras células vasculares que invaden el parénquima lúteo en desarrollo. Posteriormente, la vascularización lútea continúa en aumento, siguiendo el modelo propuesto por Reynolds *et al.* (2000), en el que se postula que las células

vasculares endoteliales producen el ON y las células peri-endoteliales (músculo liso vascular y pericitos) producen el VEGF, con lo que se garantiza una regulación coordinada de la vasodilatación lútea y la angiogénesis.

### **1.10. Flujo sanguíneo**

Funcionalmente, en rumiantes, los vasos arteriovenosos y las vénulas permiten el paso del flujo sanguíneo hacia el cuerpo lúteo (Shirasuna *et al.* 2012b). Este flujo se incrementa en la fase lútea media, por lo que tanto la cantidad de LH, como la de otras sustancias (oxígeno, glucosa, colesterol etc.) que llegan al cuerpo lúteo se incrementan en consecuencia (Niswender *et al.* 1975).

Las células endoteliales vasculares pueden constituir más del 50% de todas las células del cuerpo lúteo (Shirasuna 2010a), lo que garantiza el flujo sanguíneo hacia dicha glándula. El ON regula el flujo sanguíneo en el cuerpo lúteo (Shirasuna *et al.* 2008), así como la secreción de progesterona a través de la regulación de la esteroidogénesis y la apoptosis de las células lúteas y de las células endoteliales (Shirasuna, 2010a). Durante esta etapa también se encuentra mayor expresión del ARNm para el VEGFA en el cuerpo lúteo (Berisha *et al.* 2016) en células luteinizadas de granulosa y en las células endoteliales (Schams *et al.* 2001). El hecho de que la eNOS y el VEGF sean detectados en el cuerpo lúteo, sugiere que se encuentran ambos en los vasos sanguíneos del cuerpo lúteo. Sin embargo, conforme el cuerpo lúteo madura, la expresión de la NOS disminuye, permaneciendo bajos en los días 16 a 18 del ciclo estral del bovino (Rosiansky-Sultan *et al.* 2006).

En el bovino, existen varios indicadores del cuerpo lúteo normal, relacionados con el flujo sanguíneo (Acosta *et al.* 2003): 1) El flujo sanguíneo y la velocidad máxima del flujo se asociaron con el incremento en las concentraciones de estradiol y el pico de la LH durante el período periovulatorio. 2) Después de la ovulación, el flujo sanguíneo por área y el volumen del cuerpo lúteo incrementan dos a tres veces. 3) En el cuerpo lúteo temprano, el flujo sanguíneo incrementa gradualmente en paralelo con el incremento en el volumen del cuerpo lúteo y con la concentración de progesterona desde el día 2 al día 5.

Cuadro 1 Cambios en la intensidad de la expresión de factores angiogénicos y vasoconstrictores que impactan al flujo sanguíneo de acuerdo con las etapas de la fase lútea.

Factor	FL temprana	FL media	FL tardía	Luteólisis	Autores
FGF-1 Bovino	↑ ARNm/ proteína	↑↑		↑↑↑	Berisha <i>et al.</i> 2006; Zheng <i>et al.</i> 1993; Neuvians <i>et al.</i> 2004
FGF-2 Bovino	↑↑	↓	↑		Berisha y Schams, 2005
FGFR-1 ovino		↑↑			Doraiswamy <i>et al.</i> 1998.
ET-1 péptido	↑	↑	↑↑	↑↑↑	Miyamoto <i>et al.</i> 2009,
ET-1 ARNm	↑↑↑	↑	↑↑	↑↑↑	Meidan y Levy, 2002
ECE-1, ARNm		↑	↑	↑↑	
Ang II	↑↑	↑			Kobayashi <i>et al.</i> 2001b
Flujo sanguíneo	↑↑↑	↑↑			Acosta <i>et al.</i> 2003

FL: Fase lútea, FGF-1 y -2: Factor de crecimiento del fibroblasto-1 y -2, FGFR-1 y -2: Receptor para el Factor de crecimiento del fibroblasto-1 y -2, ET-1: endotelina-1, ECE: enzima convertidora de endotelina-1, AngII: Angiotensina II. Las flechas indican niveles altos (↑), mayor concentración (↑↑) y máximos niveles (↑↑↑), bajos niveles (↓). El flujo sanguíneo incrementa gradualmente en paralelo con el aumento en el volumen del cuerpo lúteo y la concentración de progesterona en el plasma desde el día 2 al 5 en bovinos (Acosta *et al.* 2003).

El crecimiento y desarrollo del folículo y del cuerpo lúteo dependen del establecimiento y permanencia de una red vascular, la cual permite el suministro de nutrientes al folículo y futuro cuerpo lúteo. Ambas estructuras también contribuyen a formar el ambiente endócrino que los rodea. Al estimular o inhibir factores, se proporciona un equilibrio entre la supervivencia y la atresia del folículo, o entre la supervivencia y regresión del cuerpo lúteo. Este equilibrio se altera y se instaura nuevamente, favoreciendo uno u otro desenlace, de acuerdo con la etapa del ciclo estral.

## **2. MODELO DE LUTEOPROTECCIÓN DEL CUERPO LÚTEO BASADO EN LA PROGESTERONA**

### ***2.1. Generalidades de la síntesis de la progesterona***

La biosíntesis de progesterona y su estimulación por la LH se ilustra en la figura 2. El segundo mensajero de la LH es el AMPc, el cual activa a la PKA, que fosforila diversas proteínas y factores de transcripción, todo lo cual resulta en un incremento en la secreción de progesterona (Needle *et al.* 2007). La LH no afecta el número total de células lúteas, pero sí incrementa el número de células positivas a  $3\beta$ -HSD en todos los estados de desarrollo lúteo (Grazul-Bilska *et al.* 1995). Al añadir LH al medio de cultivo de tejido lúteo se induce un incremento en la producción de progesterona (Laird *et al.* 2013). Además, en células de la granulosa cultivadas, la adición de IGF-1 y de LH estimularon la producción de progesterona y del VEGF (Schams *et al.* 2001).

Ciertas condiciones intrafoliculares pueden contribuir al incremento en las concentraciones de progesterona. La condición hipóxica presente después de la ovulación contribuye al establecimiento de la vascularización lútea en el bovino (Nishimura y Okuda, 2010). En rumiantes, los días 1 al 5 del ciclo se encuentran dentro del período angiogénico (Schams y Berisha 2002; Berisha *et al.* 2016). Los estudios de Nishimura y Okuda (2010) en el bovino, indican que el factor inducible por hipoxia -1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) fue más abundante durante la fase lútea temprana. Conforme avanza la fase lútea y el cuerpo lúteo se vasculariza, disminuye el ARNm para HIF-1 $\alpha$ . La disminución en dicho factor promueve la síntesis de progesterona durante la luteinización (Yoshioka *et al.* 2017). Este incremento en las concentraciones de progesterona es mediado principalmente por un incremento en los niveles de expresión de la proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis (StAR, por sus siglas en inglés), y en menor medida por un incremento en la actividad de la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (por sus siglas en inglés,  $3\beta$ -HSD) en células de la granulosa luteinizadas (Fadhillah *et al.* 2014; Yoshioka *et al.* 2017).

A esta elevación de las concentraciones de progesterona se le suma la gran capacidad de las células en proceso de luteinización para proliferar y o incrementar su secreción de progesterona en respuesta

al FGF-1, al FGF-2 y a la LH (Grazul-Bilska *et al.* 1995). Igualmente, el FGF-2 está relacionado con el desarrollo vascular lúteo (Zheng *et al.* 1993).

## **2.2 ¿De que dependen las concentraciones de progesterona?**

Las concentraciones de progesterona dependen del volumen de tejido lúteo y de la maduración del cuerpo lúteo. El tejido lúteo y la concentración de progesterona incrementan en un índice similar durante el crecimiento del cuerpo lúteo, pero durante la regresión el tejido lúteo disminuye más lentamente que la concentración de progesterona (Kastelic *et al.* 1990). La disminución de la funcionalidad del cuerpo lúteo se muestra por la disminución en su peso y en la concentración de progesterona, las cuales se modifican de acuerdo con la etapa de maduración del cuerpo lúteo (Mares *et al.* 1962). La variación en el peso total de tejido lúteo en ovejas se debe a que el tamaño de las células grandes, el número de células lúteas pequeñas (Farin *et al.* 1986) y el número de células endoteliales (en Niswender *et al.* 2000) se modulan conforme transcurre el ciclo. Las concentraciones circulantes de progesterona se correlacionan con el área de tejido lúteo medida por ultrasonografía entre los días 2 al 11 en vaquillas (0.73, Kastelic *et al.* 1990). Además, las concentraciones de progesterona en suero se correlacionan con las concentraciones lúteas de ARNm para StAR, P450scc y 3 $\beta$ -HSD (Juengel *et al.* 2000).

## **2.3. Acciones de la progesterona**

La progesterona es una hormona esteroide que se secreta principalmente por el cuerpo lúteo y por la placenta, aunque también se produce en pequeñas cantidades en las glándulas adrenales, en las células foliculares, y en los testículos en el macho. Las acciones de la progesterona son diversas y no necesariamente tienen que ver con la reproducción, por lo que sus receptores se encuentran también distribuidos en el sistema nervioso (Petersen *et al.* 2013). Sin embargo, se acepta universalmente que la principal función de la progesterona es el mantenimiento de la gestación. La progesterona es uno de los factores antiluteolíticos que se producen en respuesta a la estimulación gonadotrópica de las células lúteas grandes y pequeñas. Esta es la hormona maestra, la cual orquesta sus acciones a través de sus receptores de membrana y nucleares, modulando el inicio o la sucesión de un ciclo estral.

Las acciones de la progesterona son mediadas a través de la unión de la hormona con sus receptores, que varían dependiendo del tipo de respuesta a regular. Las acciones transcripcionales lentas son llevadas a cabo por la vía genómica, actuando en el receptor nuclear de progesterona (PRn). Los eventos de señalización rápidos se llevan a cabo por receptores membranales de progesterona (PRm).



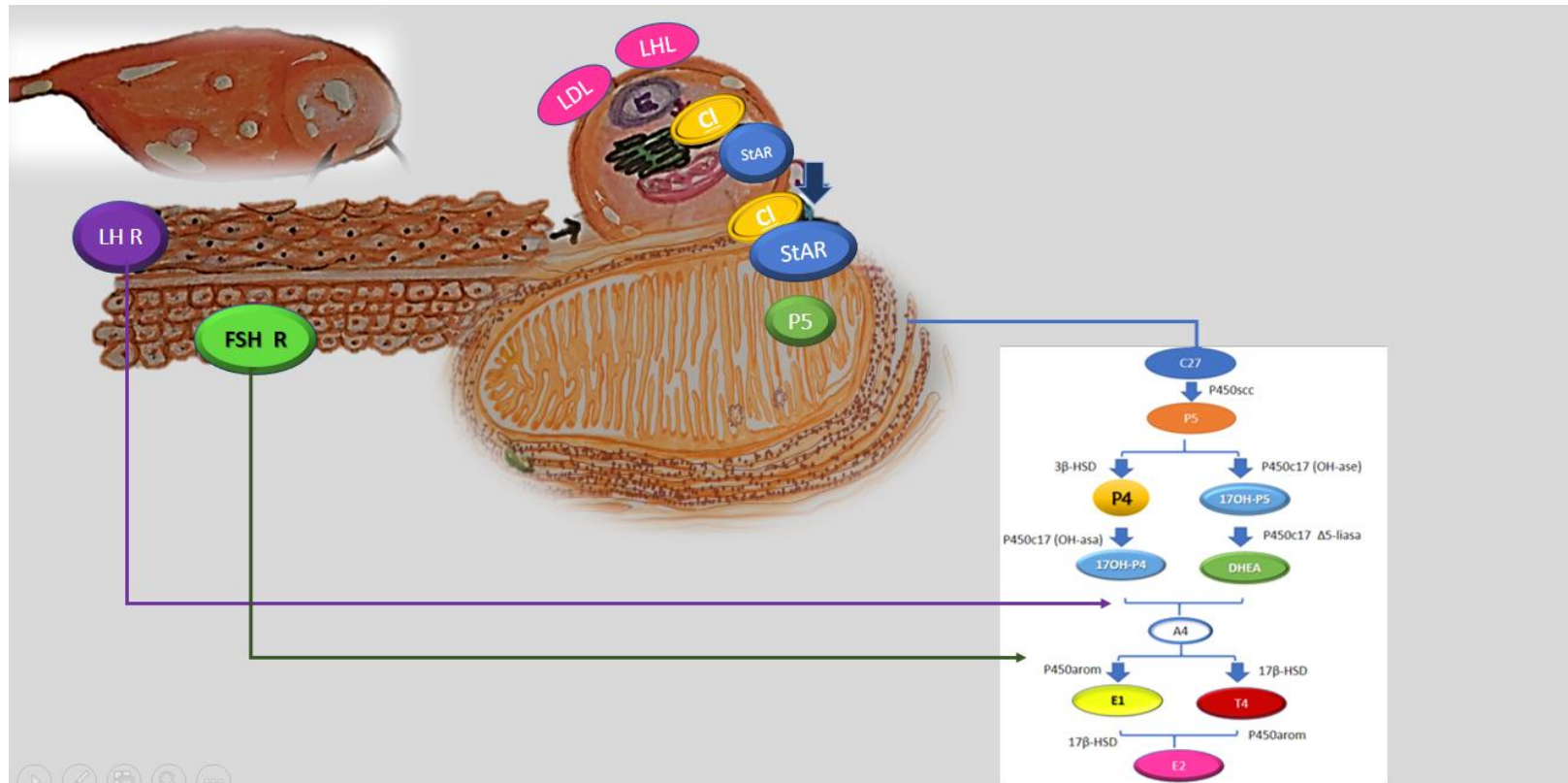


Figura 2. Síntesis de esteroides. La biosíntesis de todos los esteroides adrenales y gonadales comienza con el transporte del colesterol (derivado de las lipoproteínas de baja y alta densidad (LDL y HDL)). El proceso de transporte de colesterol a la membrana mitocondrial externa y su translocación a la membrana mitocondrial interna es llevado a cabo por la proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis (StAR, por sus siglas en inglés). Para iniciar la síntesis de esteroides es indispensable que el colesterol sea translocado a la membrana mitocondrial interna, porque en ella se localiza la enzima Citocromo P450scc (scc= side-chain cleavage, corte de la cadena lateral), que como su nombre lo indica, escinde la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona (P5), que es la molécula precursora de todos los esteroides, incluyendo la progesterona. La teoría “dos células, dos gonadotropinas” indica que la LH actúa en receptores de las células de la teca interna para estimular la síntesis de andrógenos. La FSH actúa en receptores de las células de granulosa para estimular la aromatización de andrógenos a estrógenos. Siglas: C27: Colesterol, P5: Pregnenolona, P4: Progesterona, 17OH-P5: 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona, 17OH-P4: 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona: DHEA: Dehidroepiandrosterona, A4: androstenediona, P450arom: P450aromatasa, T4: testosterona, 17 $\beta$ -HSD: 17 $\beta$  hidroxiesteroide deshidrogenasa, 3 $\beta$ -HSD: 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, E2: Estradiol-17 $\beta$ . Basado en: Stocco y Clark, 1997, Conley y Bird, 1997, Drummond y Findlay, 1999, Stocco *et al.*2000.

### 2.3.1. El mecanismo clásico de acción de la progesterona

Clásicamente se ha considerado que las acciones de la progesterona son mediadas por receptores nucleares, de los que existen dos tipos (PRn – A y PRn - B). Su interacción con la progesterona induce a coactivadores o corepresores que modulan la maquinaria transcripcional (Chabbert-Buffet *et al.* (2000). Estos receptores contienen tres dominios funcionales, el dominio amino terminal, el dominio de unión para el ADN (DUA) y el dominio de unión al ligando (LUB). El DUA está altamente conservado y dentro de su secuencia están codificados dos “dedos de zinc” para la unión con ADN (Graham y Clarke 1997). El LUB además de interactuar con el ligando tiene sitios de interacción con proteínas de choque térmico (Gadkar-Sable *et al.* 2005). Los receptores nucleares de la progesterona reconocen elementos de respuesta específicos localizados en la región promotora de los genes blanco. El ARNm del PR se expresa en las células lúteas grandes y pequeñas del cuerpo lúteo del bovino durante la etapa media de la fase lútea (Rueda *et al.* 2000).

### 2.3.2. Acciones clásicas de la progesterona

Los PRn juegan un papel importante en la ovulación y en la inducción de genes asociados con la diferenciación de las células lúteas. Este tipo de receptores median efectos que no son rápidos, ya que se requiere de horas (Bishop y Stormshak, 2008) para inducir la transcripción de los genes y producir las proteínas correspondientes (Singh *et al.* 2013). Las concentraciones del PRn en las células endometriales se incrementan durante el proestro, cuando las secreciones de los estrógenos son generalmente máximas, mientras que la secreción de progesterona incrementa durante el diestro y se asocia con una reducción significativa en la concentración del PRn en dichas células (Zelinski *et al.* 1982). En la oveja, la progesterona inhibe la frecuencia de los pulsos de la LH (Whisnant y Goodman, 1994). El mecanismo por el cual la progesterona puede realizar esta acción es mediado por receptores nucleares de progesterona (Chabert-Buffet *et al.* 2000). No obstante, los receptores para progesterona no se expresan en las neuronas productoras de la GnRH en la oveja (Chabbert-Buffet *et al.* 2000), por lo que el efecto de la progesterona sobre la secreción de este polipéptido deberá ser de manera indirecta. En efecto, la actividad de la progesterona en el núcleo arcuato está mediada a través de la dinorfina A (Goodman *et al.* 2011). Dicho péptido, es un péptido opioide inhibitorio que se colocaliza con los receptores alfa para los estrógenos en diversas áreas del hipotálamo ovino (Nestor *et al.* 2013). La dinorfina A inhibe las conexiones de las neuronas KNDy (kisspeptina, neurocinina y dinorfina A) en el núcleo arcuato para controlar la secreción episódica de la GnRH en la oveja (Goodman *et al.*

2013). Por otro lado, es probable que los efectos antiapoptóticos de la progesterona en el cuerpo lúteo sean mediados por el receptor de progesterona (Rueda *et al.* 2000).

### 2.3.3. La vía no clásica

Los receptores membranales de progesterona pertenecen a la familia de receptores de progesterona tipo II y adiponectina (PAQR), que incluye al receptor de membrana PRm (PQR7), al PQR alfa-épsilon (PAQR7, 8, 5, 6 y 9) y una proteína de la familia parecida al b5 heme/esteroide, el cual incluye al Componente 1 del Receptor de Membrana de Progesterona (PGRMC1 y 2, por sus siglas en inglés), también llamado neuferricina (Petersen *et al.* 2013). Los PRm tienen 7 dominios transmembranales y se han detectado en el hipotálamo, hipófisis, ovario y cuerpo lúteo (Bishop y Stormshak 2008). En el ovino se ha sugerido que la progesterona puede estimular el incremento en los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular a través de PRm (Ashley *et al.* 2006). La otra clase de receptores son de la familia de proteínas de unión con grupo heme/esteroides, que incluyen un receptor de membrana, el componente 1 (PGRMC1, -2, neurodesina y neuferricina (Petersen *et al.* 2013). El PGRMC1 tiene un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático, con secuencias que se unen a tirosina cinasa. Los receptores para progesterona de la familia de adipoQ/progestina (PAQR), el PGRMC1 y su inhibidor serpin peptidasa y la proteína 1 de unión al ARNm (SERBP1), median las acciones rápidas de la progesterona. El PGRMC1 y el SERBP1 se expresan en las neuronas productoras de GnRH, por lo que debe haber una acción directa de la progesterona sobre las neuronas de la GnRH a través del receptor PGRMC1 para inhibir la actividad neuronal (Bashour y Wray, 2012).

El PGRMC1 activa directamente las vías de señalización de cinasa extracelular (ERK) (Singh *et al.* 2013), el AMPc/PKA e IP3, lo que resulta en la activación del  $Ca^{2+}$  (Bishop y Stormshak, 2008). Al parecer, por esta vía la progesterona o sus metabolitos pueden actuar sobre el receptor del GABA para regular la función celular (Deutsch *et al.* 1992, citado por Singh *et al.* 2013).

### 2.3.4. Acciones no clásicas de la progesterona

Se han usado diferentes términos para referirse al mecanismo no clásico de acción la progesterona, el término más propio sería “no transcripcional” ya que no se requiere la unión del receptor con el ADN ni la síntesis de ARN (Simoncini y Genazzani, 2003). Los efectos de la progesterona actuando por esta vía son tan rápidos que no pueden involucrar la transcripción y la síntesis de proteínas (Simoncini y Genazzani, 2003). Las acciones estimuladas por esta vía se pueden detectar en segundos o minutos

(Bishop y Stormshak, 2008), ya que pueden activar rápidamente la vía de señalización intracelular a través de segundos mensajeros (Singh *et al.* 2013).

Una de las acciones no genómicas de la progesterona es inhibir la unión de la oxitocina con su receptor endometrial (Bishop y Stormshak, 2008). Grazzini *et al.* (1998) fueron, desde los alcances de esta revisión, los primeros en sugerir que la disminución en la sensibilidad uterina a la oxitocina está dada por una acción no genómica de la progesterona, específicamente sobre su receptor. Además, en ovinos, la presencia de progesterona intralútea inhibe la capacidad de la oxitocina para incrementar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células lúteas pequeñas, y la habilidad de la  $\text{PGF}2\alpha$  para incrementar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células lúteas grandes (Davis *et al.* 2010). Los mismos autores mencionan que además las altas concentraciones de progesterona alteran el contenido de colesterol en las membranas de las células lúteas. La progesterona también puede actuar suprimiendo la unión de los receptores de oxitocina en la membrana plasmática de las células endometriales (Dunlap y Stormshak, 2004) y bloqueando la vía de señalización del receptor de oxitocina en el endometrio (Bishop, 2013). La progesterona intralútea suprime la apoptosis inhibiendo las acciones de la oxitocina tales como la inducción del ARNm para Fas y la activación para caspasa-3 en el bovino (Okuda *et al.* 2004). En la rata, la presencia de progesterona en el medio de cultivo no sólo revierte el incremento de las caspasa-3, sino también disminuye su actividad (Accialini *et al.* 2015). El PGRMC1 suprime la expresión de Harakiri, un miembro de la familia Bcl-2 en células de granulosa (Will *et al.* 2017). Además, Dunlap y Stormshak, (2004) demostraron que la administración de progesterona es capaz de suprimir la unión de la oxitocina con su receptor endometrial en la oveja, de manera dependiente de la dosis (Bishop y Stormshak, 2006).

La progesterona disminuye la absorción de calcio extracelular que se requiere para la contracción de las células miometriales, regulando a la baja la expresión de los genes que codifican los canales dependientes de voltaje (Batra, 1986, citado por Niswender *et al.* (2000).

La progesterona ejerce efectos antiluteolíticos durante el diestro y durante la preñez temprana, y ejerce sus acciones a través de la vía transcripcional (regulación negativa hacia receptores estrogénicos en el endometrio) y la vía no transcripcional (disminuir la sensibilidad del útero a la oxitocina).

#### 2.4. La PGE2, en apoyo a la luteoprotección

A la par de los eventos relatados anteriormente, en el cuerpo lúteo se manifiesta otro mecanismo luteoprotector, también utilizado durante la gestación temprana. La PGE2 se origina tanto en el útero como en el *conceptus* (Silvia *et al.* 1984), así como en los astrocitos y tanicitos hipotalámicos

(Clasadonte *et al.* 2011). La PGE2 es parte del mecanismo luteoprotector durante la luteólisis estructural, ya que tanto la PGE2 como la PGF2 $\alpha$  suprimen la apoptosis de células lúteas grandes y atenúan la expresión del ARNm para caspasa 3 y 8 y la actividad de la caspasa 3 en células tratadas con TNF/INF $\gamma$  (Bowolaksono *et al.* 2008). La PGE puede prevenir la luteólisis mediante la prevención de la pérdida del ARNm para los LHR, así como de la pérdida de los LHR ocupados y no ocupados en el tejido luteal (Weems *et al.* 2011). De hecho, en bovinos, la PGE2 puede por ella sola retrasar la luteólisis (Weems *et al.* 2011).

### **3. CARACTERIZANDO A LA PGF2 $\alpha$**

#### ***3.1. Línea de tiempo de la historia de la PGF2 $\alpha$***

En las décadas pasadas se ha estudiado a profundidad a la PGF2 $\alpha$ , tanto por su importancia biológica como por su utilización en la sincronización de estros en rumiantes. Los investigadores de aquel entonces pusieron sobre la mesa varias hipótesis que han sido comprobadas posteriormente, dando como resultando nuevas tecnologías reproductivas. A la par, se fué creando nueva terminología. La “capacidad luteolítica”, “mecanismos de auto-amplificación”, “resistencia del cuerpo lúteo a la PGF2 $\alpha$ ” o “luteólisis parcial” son parte de dicha terminología. Estos conceptos permiten entender algunos de los mecanismos menos comprendidos de la luteólisis, y tratan de explicar la falta de respuesta estral de algunos animales después de un tratamiento con PGF2 $\alpha$ .

La historia de estos eventos comienza en un laboratorio de la Universidad de Minnesota en 1929. Burr y Burr (1929) reportaron que la deficiencia de grasas en la dieta producía una nueva enfermedad relacionada con la cantidad de grasa en el cuerpo. Un año después, los mismos autores (1930) descubrieron que los ácidos linoléico y linolénico son esenciales e importantes para la reproducción en hembras y machos. En 1931, Euler y Gaddum (1931) extrajeron de la próstata una sustancia de naturaleza vasodilatadora que estimulaba la contracción del útero del cobayo. Bergström y sus colaboradores (1964), establecieron una vía bioquímica para la síntesis de prostaglandina E a partir de ácidos grasos esenciales, explicando los requerimientos dietarios que años antes se habían reportado. No obstante, la importancia de la luteólisis en el control del ciclo estral comenzó a ser aparente en la década de los 20's, cuando se reportó que la remoción del CL del ovario de la vaca o de la oveja apresura el inicio del estro (Williams y Williams, 1921 citado por Dutt y Casida, 1948). Los mismos autores empezaron a utilizar el término “sincronizar”, refiriéndose a la alteración del ciclo estral en la oveja usando progesterona. En 1969, los estudios pioneros de Pharriss y Wyngarden (1969) mostraron un cambio en la naturaleza de los esteroides en ratas pseudopreñadas tras la

administración de la PGF2 $\alpha$  por vía subcutánea. La década de los 70's enmarcó los descubrimientos que enlazaron los caminos del cuerpo lúteo y la prostaglandina F2 $\alpha$  en diversas especies. La principal pregunta por responder se enfocaba en los mecanismos que provocaban la liberación de prostaglandinas desde el útero. En ovinos, los estudios del grupo de McCracken *et al.* (1970; McCracken, 1971; McCracken *et al.* 1972), así como el trabajo de Thorburn y Nicol (1971), fueron un referente para Inskip (1973) y para Douglas y Ginther (1973). Estos últimos autores determinaron que la administración sistémica de prostaglandina F2 $\alpha$  es efectiva para sincronizar el estro en bovinos, con lo que imaginaron un uso potencial en el control del ciclo reproductivo en los animales domésticos. En 1973, Rowson, Tervit y Brand (citados por Dobson *et al.* 1975), habían demostrado que la administración intrauterina de la PGF2 $\alpha$  es capaz de provocar la regresión del cuerpo lúteo bovino. Poco antes se reportó que la síntesis de progesterona puede ser inhibida *in vitro* por PGF2 $\alpha$  (O'Grady *et al.* 1972). Durante ese año también se adelantaba el conocimiento relacionado con el desarrollo de técnicas para medir el metabolito de la PGF2 $\alpha$  (Granström y Samuelson, 1972), así como el conocimiento en la síntesis de la PGF2 $\alpha$  en diferentes especies (Samuelsson y Green, 1974). Debido al creciente interés en el estudio de esta hormona y sus múltiples acciones, en investigaciones independientes, Roche (1974) y Lauderdale *et al.* (1974) evaluaron la administración de diferentes dosis de esta hormona en días diferentes del ciclo estral. El año 1974, se publicó una demostración de todas las evidencias que demostraban que la PGF2 $\alpha$  es la luteolisina de origen uterino en la oveja, en honor a James R. Goding. En esa revisión se debatieron las evidencias a favor y en contra de la existencia de una luteolisina uterina, la cual era la PGF2 $\alpha$ , y que su secreción uterina era suficiente para llevar a cabo la luteólisis. Sin embargo, aún faltaban muchas preguntas por responder. ¿Cuál era el mecanismo por el cual la PGF2 $\alpha$  causaba luteólisis en la oveja? ¿era necesaria alguna acción directa del estradiol sobre el ovario? También se debatía si la prostaglandina y sus análogos podrían ser usados para manipular el ciclo reproductivo de varias especies. En la oveja, Corteel (1975), fue un pionero en la comparación de la luteólisis natural con la luteólisis inducida. Ese mismo año, Umo (1975) pudo identificar las células lúteas grandes y pequeñas del cuerpo lúteo. Los autores sugirieron que la PGF2 $\alpha$  disminuye la actividad secretora de estas células, aunque su habilidad para sintetizar lípidos y convertirlos en hormonas esteroideas no se pierde.

El término “sincronización del estro” adquirió importancia durante la primera mitad de la década de los 1970's. Las investigaciones en esta área se hicieron tanto con PGF2 $\alpha$  natural como con diversos análogos sintéticos (Tervit *et al.* 1973, Baird y Scaramuzzi, 1975). También en esa época, los descubrimientos de Baird (1974) establecieron la relación de la PGF2 $\alpha$  con el flujo sanguíneo del

ovino. En 1977, Pratt *et al.* (1977) fueron de los primeros investigadores en proponer que la PGE<sub>2</sub> tenía una actividad antiluteolítica en ovejas. A partir de entonces los estudios sobre la prostaglandina centraban su interés en conocer más sobre sus efectos sobre la regresión del cuerpo lúteo o la terminación de la preñez y la inducción del parto en diversas especies.

Durante años se trabajó bajo el supuesto de que después de la administración de una dosis suficiente de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , el cuerpo lúteo irremediablemente sufrirá luteólisis. Pero con el tiempo se hizo patente un hecho que, si bien se había reportado, no se había estudiado o demostrado a profundidad. Schram *et al.* (1983) reportaron la recuperación de las concentraciones de progesterona después de una caída inicial provocada por la PGF<sub>2</sub> $\alpha$ . Ese mismo año se mostró que la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  podía efectuar grandes cambios a nivel celular. Heath *et al.* (1983), después de la inyección de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , observaron una disminución en los porcentajes de gránulos en el citoplasma de las células lúteas grandes y una mayor sensibilidad de dichas células a los efectos de la luteolisina. Asimismo, mostraron una elevación transitoria de progesterona y su subsecuente declinación después de ser tratadas con PGF<sub>2</sub> $\alpha$ . Los ochentas estuvieron marcados por los descubrimientos acerca de los pulsos de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$ . McCracken *et al.* (1984), propusieron una hipótesis sobre la importancia de los pulsos de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  liberados desde el útero. Zarco *et al.* (1988a) determinaron por primera vez el número de pulsos y el intervalo inter-pulsos que ocurren durante la luteólisis natural. También se demostró que la ausencia de pulsos frecuentes podría resultar en la persistencia espontánea del cuerpo lúteo (Zarco *et al.* 1984), y que en los animales gestantes se suprime el patrón pulsátil de secreción de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , lo que evita la regresión del cuerpo lúteo (Zarco *et al.* 1988b) en la oveja. De esta forma, durante el siglo pasado se sentaron las bases para los conceptos que hoy en día se manejan.

### **3.2. Síntesis de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$**

En la figura 3 se ilustra la síntesis de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$ . Esta hormona se sintetiza a partir del ácido araquidónico liberado de los fosfolípidos de la membrana plasmática, por lo que la disponibilidad de ácido araquidónico libre es el paso limitante para la síntesis de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$ . La liberación de ácido araquidónico a partir de fosfolípidos de la membrana celular es realizada por la fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica (PLA<sub>2</sub>c) (Gijón y Leslie, 1999). El ácido araquidónico o ácido eicosa-5,8,11,14 tetraenóico es un ácido graso polinsaturado de 20 carbonos de la serie omega-6, que puede obtenerse directamente de la dieta o de manera endógena a partir de ácido linoléico. Su liberación a partir de fosfolípidos de la membrana es catalizada por la enzima PLA<sub>2</sub>c. Esta enzima se regula por un incremento en el Ca<sup>2+</sup> intracelular. En el endometrio la unión de la oxitocina a su receptor puede estimular este incremento. El calcio se une al dominio terminal amino C<sub>2</sub> de la PLA<sub>2</sub> e induce su translocación a la envoltura

nuclear y al retículo endoplásmico (Gijón y Leslie 1999). Una vez liberado hacia el citoplasma, el ácido araquidónico puede ser transformado en otros compuestos por las ciclooxigenasas (COX) y las lipoxigenasas que se localizan en la envoltura nuclear y en el retículo endoplásmico. Existen diversas isoformas de la enzima COX: las COX-1 predominan en el retículo endoplásmico, mientras que las COX-2 pueden existir en el retículo, pero también en la envoltura nuclear (Morita *et al.* 1995). La COX-1 es una enzima constitutiva, mientras que la COX-2 es inducible (Smith *et al.* 2000). Estructuralmente, la COX-1 y la COX-2 son similares, pero el sitio de unión para el ácido araquidónico es diferente. La COX-2 presenta un canal más amplio en su estructura (Meijide y Gómez-Reino, 2000). Tanto la PLA2c como la COX están en proximidad subcelular, y cuando se libera el ácido araquidónico por la PLA2c (Tithof *et al.* 2007) es utilizado en seguida por la COX-2. Dicha enzima utiliza preferentemente ácido araquidónico endógeno, mientras que la COX-1 utiliza el ácido araquidónico exógeno (Chulada *et al.* 1996). El ácido araquidónico que ha sido liberado por la PLA2c es presentado a la COX, también llamada prostaglandina H sintasa (PGHS, Funk, 2001), la cual lleva a cabo un proceso de ciclo-oxigenación para formar la prostaglandina H (PGH). Posteriormente, la PGH puede ser procesada por diversas enzimas que la transforman en diferentes tipos de prostaglandina. La enzima PGF sintasa pertenece a la familia de las aldo-ceto-reductasas (AKR, por sus siglas en inglés), la PGF2 $\alpha$  sintasa de protozoarios es miembro de la familia AKR5A, mientras que en mamíferos la actividad de PGF2 $\alpha$  sintasa se ha encontrado en miembros de la familia AKR1B y AKR1C. La AKR1B5 se expresa en el endometrio bovino con fuerte actividad de PGF2 $\alpha$  sintasa (Watanabe, 2011). Aparte de esta vía de síntesis, como se observa en la figura 4, la PGE y la PGD sintasa, pueden sintetizar a la PGF2 $\alpha$  a través de 9-ketoreductasa y 11-ketoreductasa, respectivamente (Madore *et al.* 2003).

### **3.3. ¿Qué factores y eventos estimulan la síntesis de la PGF2 $\alpha$ ?**

La regulación de la síntesis de la PGF2 $\alpha$  en el endometrio de los rumiantes involucra principalmente a la progesterona, al estradiol y a la oxitocina.

#### **3.3.1. Con respecto a la progesterona...**

La secreción de la progesterona y su acción durante 10 a 12 días en las células epiteliales del endometrio se conoce como “priming” (preparador). Durante este periodo de exposición a la progesterona, que se presenta durante la fase lútea, el endometrio prepara la secreción de la PGF2 $\alpha$  que llevará a cabo la regresión del cuerpo lúteo (Caraty y Skinner, 1999). También durante ese período de tiempo la progesterona modula la dirección de la producción de prostaglandinas



específicas, a través de su efecto sobre la disponibilidad del ácido araquidónico disponible para la prostaglandina sintasa (Dey *et al.* 1982). Al mismo tiempo, durante este periodo, la progesterona es capaz de regular a la baja la expresión de los receptores para estradiol y la oxitocina en el endometrio de los rumiantes (Bishop, 2013). Por lo anterior, uno de los principales estímulos que llevan a la síntesis de la PGF2 $\alpha$ , es la desensibilización de los receptores para progesterona en las células endometriales (Davis *et al.* 2010), lo que permitirá la expresión de receptores para oxitocina. Aunque la progesterona prepara el endometrio para la síntesis de la PGF2 $\alpha$ , se requiere de las acciones conjuntas de estradiol y oxitocina para su liberación episódica (dos Santos *et al.* 2009). Sin embargo, el efecto preparador de la progesterona puede ser la razón por la cual, las vacas que tuvieron concentraciones mayores de progesterona durante la fase lútea liberaron más PGF2 $\alpha$  y su metabolito en respuesta a la oxitocina y estradiol (dos Santos *et al.* 2009).

### 3.3.2 El estradiol...

La exposición de las células epiteliales del endometrio a progesterona durante más de 10 días, lleva a la pérdida de los receptores genómicos de la progesterona, lo cual conduce a un incremento en los receptores para estrógenos (Bishop 2013). Esto es importante ya que los estrógenos son incapaces de activar a la PLA2 cuando el útero está bajo la dominancia de progesterona (Dey *et al.* 1982). Una vez que pueden actuar, los estrógenos estimulan a la COX-2, además de la acumulación de Ca<sup>2+</sup> en las caveolas. Por otro lado, los estrógenos mejoran las acciones de la oxitocina ya que el receptor beta estrogénico incrementa la cantidad de péptido producido, mientras que el receptor alfa incrementa la expresión del receptor (Rissman, 2008). Además, estimulan la producción de la PGF2 $\alpha$  uterina (Dey *et al.* 1982).

Durante los días 1-3 del ciclo estral, el número de receptores de progesterona fueron más altos en las células del estroma que en las células epiteliales, mientras que el número de receptores para estradiol estuvieron más altos en las células epiteliales (Xiao y Goff, 1999). La progesterona estimula la secreción de la PGF2 $\alpha$  por el endometrio y el estradiol lo amplifica (Skarzynski *et al.* 1999). El estradiol regula su propio receptor e incrementa el número de receptores de progesterona y estradiol *in vitro*, mientras que la progesterona inhibe el incremento inducido por el estradiol sobre los receptores de progesterona en ambos tipos celulares (Xiao y Goff, 1999).

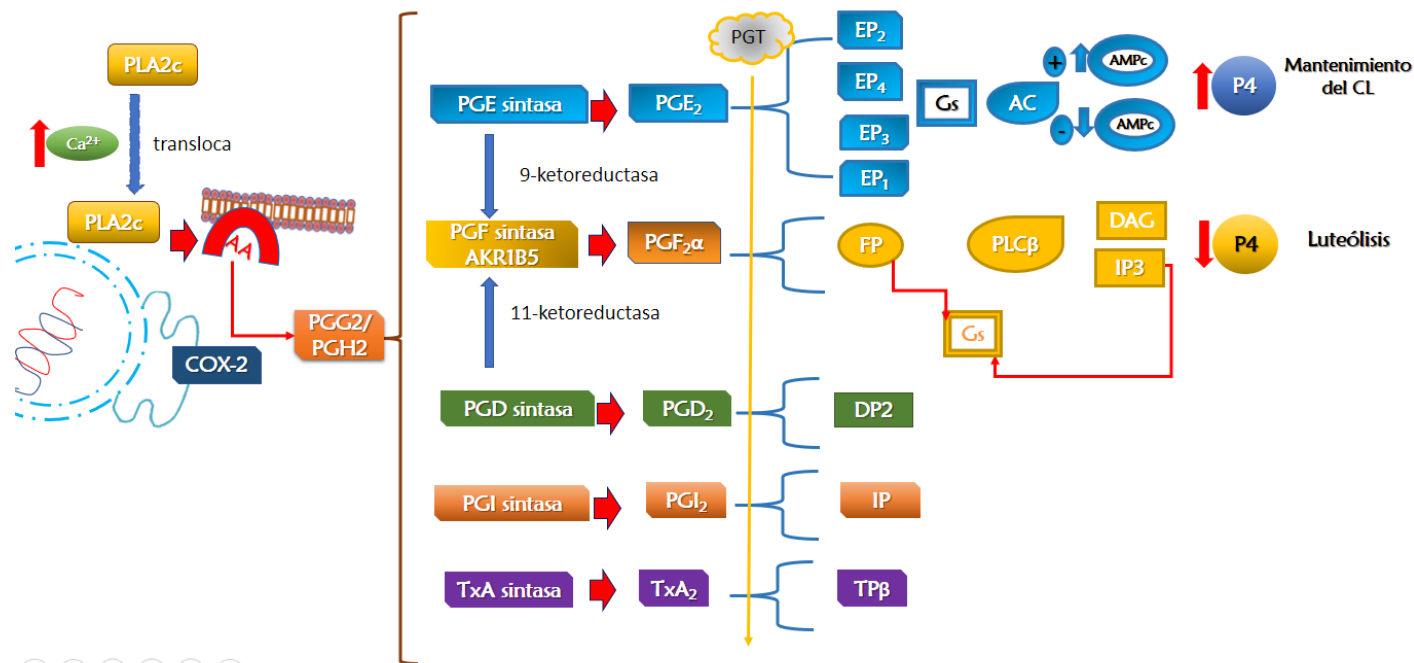


Figura 3. Síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. El ácido araquidónico (AA) puede ser metabolizado por las vías lipoxigenasa o ciclooxigenasa para formar eicosanoides, incluyendo a los leucotrienos, las prostaglandinas y los tromboxanos. La  $PGF_2\alpha$  es sintetizada a partir del AA liberado de los fosfolípidos de la membrana plasmática por la fosfolipasa A2 (PLA2). El ácido araquidónico es transformado por la ciclooxigenasa-2 en prostaglandina G2 (PGG2) y de inmediato en prostaglandina H2 (PGH2), la cual se transforma a prostaglandina F2  $\alpha$  ( $PGF_2\alpha$ ) por la enzima prostaglandina sintasa (PGFS). También puede haber interconversión entre de a PGE2 y  $PGF_2\alpha$  por medio de la enzima PGE2-9-ceto reductasa y por la PGD-11-cetoreductasa. Siglas: PGE sintasa: prostaglandina E sintasa, PGE2: prostaglandina E2, EP2, EP4, EP3 : receptores de la prostaglandina E, AC: adenil ciclasa, P4: progesterona, DAG: diacilglicerol, IP3: inositol tri fosfato, PLC $\beta$ : fosfolipasa C $\beta$ , Gs: proteína G, PGT: proteína transportadora de prostaglandina, AKR1B5: aldo-ceto-reductasa 1 B5, PGD: prostaglandina D2, PGI: prostaglandina I2, TXA2: tromboxanos, DP2: receptor de PGD2, IP: receptor de PGI2, TP $\beta$ : receptor de tromboxanos. Basado en Okuda *et al.* 2002; McCracken *et al.* 1999; Gijón y Leslie 1999; Davis *et al.* 1996; Arosh *et al.* 2004; Clasadonte *et al.* 2011; Madore *et al.* 2003; Díaz *et al.* 2002.

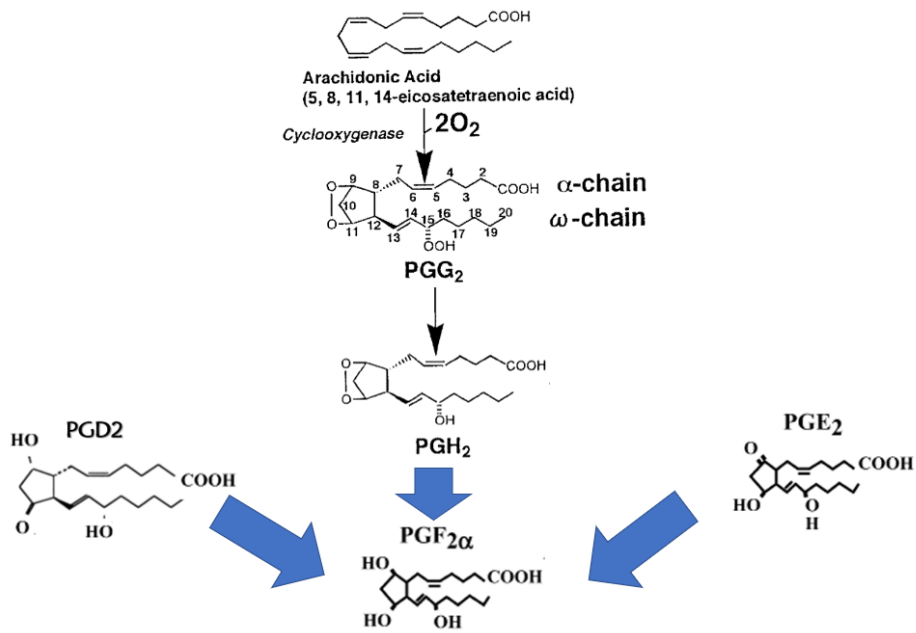


Figura 4. Síntesis de la PGF<sub>2</sub>α a partir de otras prostaglandinas. PGG<sub>2</sub>: prostaglandina G<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>: prostaglandina H<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>: prostaglandina D<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α: prostaglandina F<sub>2</sub>α. Basado Narumiya *et al.* 1999, Bos *et al.* 2004.

### 3.3.3. En el caso de la oxitocina...

Ya desde mediados del siglo pasado, Armstrong y Hansel reportaron los efectos de la oxitocina sobre la regresión lútea de la vaca (Sheldrick y Flint, 1984). A mediados de los 70's y principios de los ochenta, Sharma y Fitzpatrick, así como Mitchell y McCracken (citados por Sheldrick y Flint, 1984), reportaron un posible papel de la oxitocina en el control de la luteólisis. El papel de la oxitocina en la luteólisis se investigó en animales inmunizados contra oxitocina, en los que la longitud del ciclo se extendió entre 3 y 7 días. Además, se reportó que la acción luteolítica del estradiol  $17\beta$  en la oveja, puede ser mediada a través de la estimulación sobre la concentración de receptores endometriales de la oxitocina. Flint y Sheldrick, (1982) mostraron que la secreción de la oxitocina de origen lúteo puede ser estimulada por cloprostenol. Un año más tarde, Sheldrick y Flint (1983) reportaron que, cuando se administraba cloprostenol a ovejas histerectomizadas, los animales presentaban luteólisis. Ellos sospechaban que la oxitocina pudiera ser sintetizada en el cuerpo lúteo pero que estaba influenciada por un factor uterino. Ese mismo año, Flint y Sheldrick (1983) identificaron al cuerpo lúteo como el origen de la oxitocina, sugiriendo que el 98% de la oxitocina luteal estuvo disponible para la secreción en respuesta a la estimulación con cloprostenol. También describieron los episodios simultáneos de secreción de oxitocina y  $PGF2\alpha$  durante la luteólisis. En cambio, los principales episodios de liberación de la  $PGF2\alpha$  ocurren después de la luteólisis y no son acompañados por la secreción de oxitocina. En añadidura a la información generada para la oxitocina, se mencionó que cada episodio de la oxitocina se termina por el agotamiento de los almacenamientos de la oxitocina. Uno de los principales análisis del papel de la oxitocina luteal fue realizado por el equipo de Flint *et al.* (1990). En este documento ponen claro que la oxitocina estimula la secreción uterina de la  $PGF2\alpha$ , que la oxitocina es sintetizada y secretada por el cuerpo lúteo del rumiante y que junto con la progesterona y el estradiol  $17\beta$  es uno de los factores involucrados en la luteólisis. Describe de manera clara los episodios de secreción sincrónicos entre oxitocina y  $PGF2\alpha$ , haciendo énfasis en que también pueden presentar episodios por separado.

Las concentraciones de receptores endometriales de la oxitocina incrementan rápidamente desde el día 13 del ciclo hasta alcanzar un máximo en los días 15 al 16 en la oveja. Este incremento se debe primariamente al retiro de la influencia inhibitoria de progesterona (Fairclough y Lau, 1992). Además, coincide con la liberación de la  $PGF2\alpha$  endógena endometrial durante la luteólisis y la máxima respuesta uterina hacia el estímulo de la oxitocina. Un par de años más tarde, Beard y Lamming (1994) ovariectomizaron a ovejas que previamente habían sido tratadas con progesterona durante los días 11 y 12 del ciclo. Ellos mostraron que las concentraciones del estradiol se

relacionaron positivamente con la respuesta de 13, 14-dihidro-15-ceto PGF $2\alpha$  (PGFM), así como la magnitud y los patrones de la respuesta de la PGF $2\alpha$  a la oxitocina en ovejas. Las concentraciones altas del estradiol causaron un rápido incremento en la concentración de PGFM después de la administración de la oxitocina, por lo que el estradiol puede estar asociado con un inicio temprano de luteólisis.

La figura 5 ilustra el mecanismo de acción de la oxitocina. Una vez que la oxitocina se une a su receptor en la membrana de la célula endometrial, activa a la proteína G $\alpha$ q/11 (Zingg y Laporte, 2003), llevando a la síntesis de la PGF $2\alpha$  (Bishop, 2013). Este efecto se produce en 30 minutos, asociado con un incremento espontáneo en la actividad de PLC *in vitro* (Burns *et al.* 1997). Las altas concentraciones de receptores para oxitocina endometriales coinciden con la liberación de PGF $2\alpha$  uterina durante la regresión luteal y la respuesta máxima de la PGF $2\alpha$  al estímulo de la oxitocina (Fairclough y Lau, 1992). Esto origina un incremento en la secreción de PGF $\alpha$  de manera gradual (Wade y Lewis, 1996) y la desaparición de la regulación a la baja que ejercía la progesterona sobre los receptores de estrógenos.

Sin embargo, mientras el endometrio está bajo la influencia de la progesterona, la oxitocina no afecta la secreción de la PGF $2\alpha$  (Skarzynski *et al.* 1999). Por lo que también se requiere de la supresión de la progesterona, para que se pueda evocar un incremento significativo en el porcentaje de células lúteas pequeñas que responden a oxitocina (Davis *et al.* 2010). Esta teoría también se apoya debido a que los receptores de la oxitocina pueden ser desensibilizados por la presencia de la progesterona por 10-12 días en la oveja (Wathes y Lamming, 1995).

Para completar la luteólisis se requiere del incremento en la síntesis endometrial de PGF $2\alpha$  y el incremento en el número de receptores para la oxitocina (Goff, 2004). Sin embargo, existen otros factores que podrían estar involucrados en este proceso de síntesis de prostaglandinas. Por ejemplo, la NOS inducible y endotelial están ambas presentes en las células del estroma (Woclawek-Potocka *et al.* 2004). El ON es estimulado por la oxitocina en células vasculares endoteliales, bajo la influencia de los estrógenos (Jankowski *et al.* 2000). Además, el ON puede inhibir la esteroidogénesis durante la luteólisis funcional (Skarzynski *et al.* 2000). El TNF $\alpha$  actúa parcialmente en las células del estroma endometrial y aumenta la síntesis de la PGF $2\alpha$ , a través de la inducción del NOS. Ambos, el ON y el TNF $\alpha$ , estimulan directamente a las células del estroma endometrial para producir PGF $2\alpha$  (Woclawek-Potocka *et al.* 2004). De la misma manera, la administración por medio de infusión de

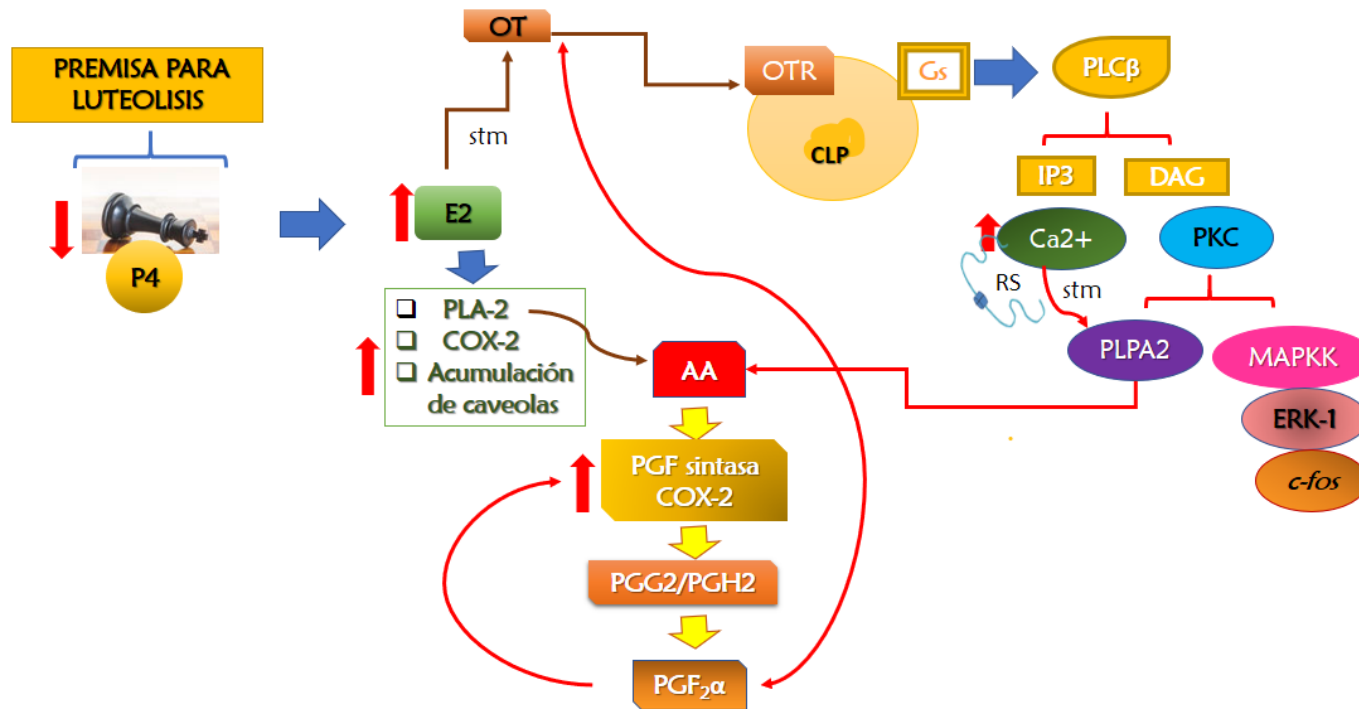


Figura 5-Mecanismo de acción de la oxitocina. Para que se lleve a cabo las acciones de la oxitocina es necesario que disminuya la sensibilidad endometrial a la progesterona. La oxitocina es liberada de la neurohipófisis y estimula la liberación de la PGF<sub>2</sub>α en el útero. La oxitocina se une a su receptor de membrana en células endometriales, e induce, por un lado, un rápido y transitorio incremento en las concentraciones intracelulares de Ca<sup>2+</sup> en células lútea pequeñas (CLP). Por otro lado, los receptores de la oxitocina en el miometrio son acoplados a proteínas Gαq/11(Gs) que estimulan la actividad de la fosfolipasa Cβ (PLPCβ), y la generación de inositol trifosfato (IP3) con la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los almacenes intracelulares. Así como del diacilglicerol (DAG) el cual, a su vez activa a la fosfolipasa A 2 (PLPA2), la cual libera al ácido araquidónico (AA) de la membrana con la subsecuente producción de la PGF<sub>2</sub>α. La PGF<sub>2</sub>α llega al endometrio por medio de un mecanismo de contracorriente y estimula la liberación de oxitocina a partir de las células lútea grandes (CLG) la oxitocina de origen lúteo a su vez causa que más PGF<sub>2</sub>α sea liberada del útero. Sin embargo, pocas células lútea grandes responden al pulso inicial de la PGF<sub>2</sub>α liberada desde el útero. Siglas: P4: progesterona, E2: estrógenos, RE: retículo sarcoplásmico, MAPKK: proteína mitógeno activada cinasa cinasa, ERK-1: cinasa extracelular, PGG2: prostaglandina G2, PGH2: prostaglandina H2, ciclooxigenasa-2 (COX-2). PGF<sub>2</sub>α: prostaglandina F2 α. Stm: estimula. Flechas rojas: incremento en sus concentraciones o disminución. Basado en Dey *et al.* 1982; Woodward y Lawrence, 1994; Graves *et al.* 1995; Chen *et al.* 1998; McCracken *et al.* 1999; Mann *et al.* 2001; Díaz *et al.* 2002; Madore *et al.* 2003; Davis *et al.* 2010.

dosis altas del TNF dentro del lumen uterino es luteotrópica, mientras que en bajas dosis induce luteólisis prematura, siendo la PGF2 $\alpha$  un mediador de estas acciones (Skarzynski *et al.* 2007).

#### **3.4. El mecanismo a contracorriente de la PGF2 $\alpha$**

La PGF2 $\alpha$  es sintetizada y se secreta de manera pulsátil desde las células epiteliales del endometrio hacia la vena uterina, la que se une a la vena ovárica para formar la vena útero-ovárica. La arteria ovárica está en contacto íntimo con la vena útero-ovárica, alrededor de la cual se enrosca formando el plexo utero-ovárico. La PGF2 $\alpha$  presente en la sangre de la vena utero-ovárica es transportado hacia la arteria uterina a través de las paredes de la vena y la arteria, pasando por alto la circulación sistémica (Lee *et al.* 2010; 2012). Este mecanismo es conocido como de a contracorriente porque la sustancia de interés (PGF2 $\alpha$ ) que está presente en altas concentraciones en la sangre de la vena, es transferido a la sangre de la arteria, que fluye en la dirección contraria a la de la sangre de la vena (Senger *et al.* 2003). El mecanismo a contracorriente de la PGF2 $\alpha$  se presenta en la figura 6. Fue descrito por McCracken *et al.* (1971 y 1972) en la oveja. La arteria ovárica corre sobre la superficie de la vena útero-ovárica antes de entrar al hilio del ovario, para posteriormente entrar a la circulación sistémica. Durante la luteólisis, el útero secreta 25  $\mu$ g de la PGF2 $\alpha$ /h, y un pequeño porcentaje de ella (alrededor del 1 %) se transfiere a través de la pared de la vena uterina hacia la circulación de la arteria ovárica. Esto permite que la hormona llegue al cuerpo lúteo antes de pasar por los pulmones, donde sería rápidamente degradada a 15-ceto-13-14-dihidro PGF2 $\alpha$ . Por esta razón, si se administra la PGF2 $\alpha$  natural por vía sistémica, es necesario emplear una dosis elevada que sature a la enzima pulmonar, la cual tiene una capacidad limitada.

Químicamente, las prostaglandinas son aniones que pueden atravesar la membrana celular por difusión simple, posiblemente manejado por el pH y el potencial de membrana. Sin embargo, solo el 20% del transporte se debe a la difusión simple en las células epiteliales endometriales del ovino (Banu *et al.* 2008). por lo que se requieren de proteínas transportadoras de aniones orgánicos. Las proteínas transportadoras de prostaglandinas tienen alta afinidad por los prostanoides y se expresan en diversos tejidos. Las proteínas transportadoras de prostaglandinas son ampliamente expresadas en el epitelio luminal y glandular del endometrio (Schuster, 2002; Banu *et al.* 2008), así como en la túnica íntima, media y adventicia de la vena útero-ovárica y de la arteria ovárica del plexo útero-ovárico (Lee *et al.* 2010). Su expresión es particularmente fuerte en los pulmones, un sitio de paso forzoso para la limpieza metabólica de prostaglandina (Nomura *et al.* 2004).

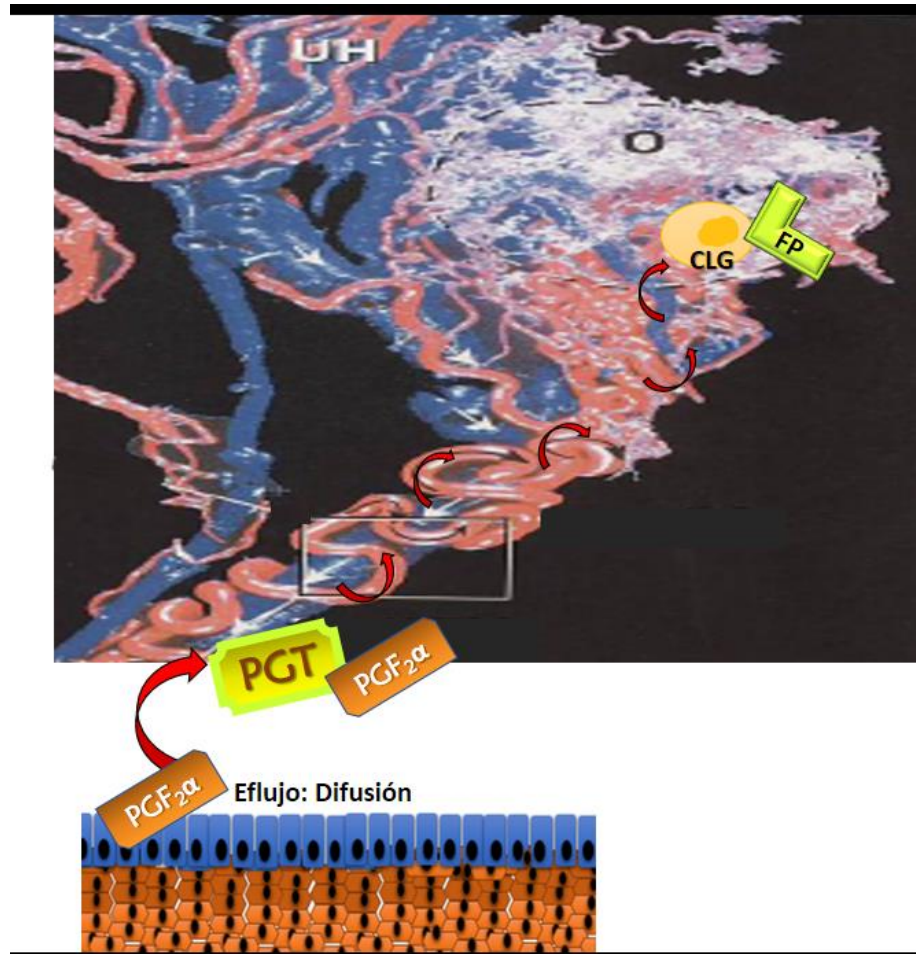


Figura 6. Mecanismo de a contracorriente de la PGF<sub>2</sub>α. Referirse al texto. Siglas: PGT: proteína transportadora de prostaglandinas, CLG: células luteas grandes, PGF<sub>2</sub>α: Prostaglandina F<sub>2</sub>α, FP: receptor de la PGF<sub>2</sub>α. Adaptado de Senger (2003).



Al tener las prostaglandinas carga aniónica, estas proteínas transportadoras de prostaglandinas las reconocen como substratos, existiendo una atracción electrostática entre los cationes de las proteínas transportadoras y los aniones de las prostaglandinas (Lee *et al.* 2013). El mecanismo de transporte parece ser el intercambio de aniones (Banu *et al.* 2008). La proteína transportadora de aniones media el eflujo e influjo de la  $PGF2\alpha$ , de manera dependiente de la dosis (Banu *et al.* 2008). La afinidad de las proteínas transportadoras para la prostaglandina es verdaderamente alta para PGE1, PGE2 y  $PGF2\alpha$  (Nomura *et al.* 2004). Tanto los mediadores luteolíticos ( $PGF2\alpha$ ) como los luteoprotectivos (PGE), necesitan ser transportados localmente desde la vena útero-ovárica a la arteria ovárica a través del plexo útero-ovárico en rumiantes (Arosh *et al.* 2004; Lee *et al.* 2012). Es por esta razón que si se inhiben las proteínas transportadoras de prostaglandinas durante el período de luteólisis, se suprime la liberación de los pulsos de oxitocina inducidos por  $PGF2\alpha$  y se mantiene el cuerpo lúteo. Si se inhibe la PGT intrauterina se inhibe la liberación pulsátil de la  $PGF2\alpha$  desde el endometrio bovino (Lee *et al.* 2013).

### **3.5. Modelo del mecanismo de acción de la $PGF2\alpha$**

La figura 7 ilustra el mecanismo de acción de la  $PGF2\alpha$ . La vía de señalización de las prostaglandinas comienza con la unión de la hormona con sus receptores de superficie acoplados a proteína G para incrementar las concentraciones de fosfolipasa C para producir inositol trifosfato (Helliwell *et al.* 2004). Kennedy *et al.* (1982), propusieron la nomenclatura para los receptores de prostanoideos. Cada receptor se designa con una letra “P”, precedida por una letra significativa del agonista natural más potente. Los receptores de cada una de las prostaglandinas se han clasificado como DP, EP (1-4), FP, IP y TP para la  $PGD2$ , PGE2,  $PGF2\alpha$ ,  $PGI2$  y  $TXA2$ , respectivamente. Las acciones de la  $PGF2\alpha$  dependen de su interacción con los receptores de superficie celular. El receptor FP consiste en siete dominios transmembranales y es miembro de la familia de receptores acoplados a la proteína G (Graves, *et al.* 1995). Contiene 362 residuos de amino ácidos y el receptor FP bovino comparte al menos 98% de homología con el FP ovino (revisado por Anderson *et al.* 2001).

El órgano que expresa más abundantemente el ARNm para FP es el cuerpo lúteo. Las concentraciones de ARNm para el FP son extremadamente bajas en células foliculares esteroideogénicas (teca o granulosa). Sin embargo, después de la ovulación, las células lúteas grandes comienzan a expresar ARNm para el FP, cuya presencia continúa incrementándose hasta que las células lúteas experimentan apoptosis (Wiltbank *et al.* 1995; Narumiya, *et al.* 1999; Anderson *et al.* 2001).

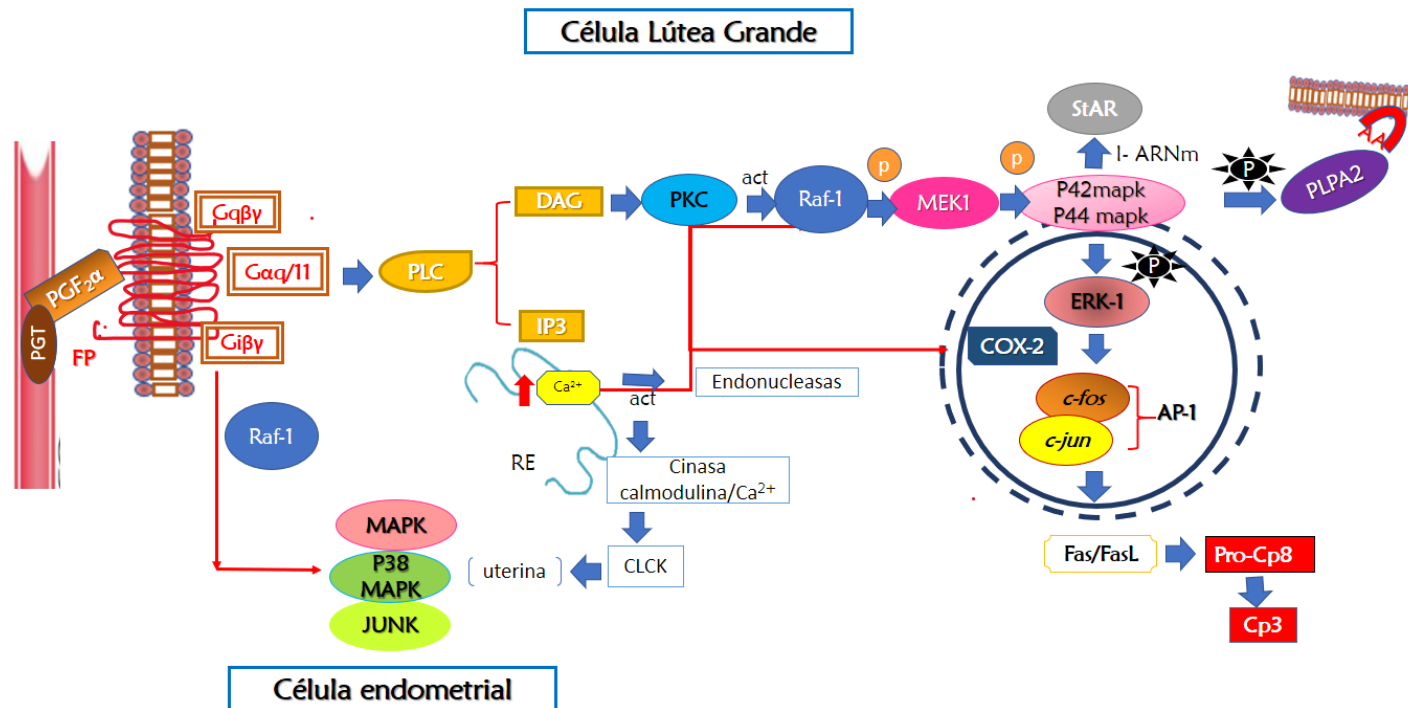


Figura 7. Mecanismo de acción de la PGF $2\alpha$ . La PGF $2\alpha$  se une a su receptor de membrana (FP) acoplados a las proteínas G $\alpha$ q/11(Gq), la que estimula la actividad de la fosfolipasa C (PLPC), y la generación del inositol trifosfato (IP3) que provoca la liberación del Ca $^{2+}$  desde el retículo endoplásmico (RE). También se produce diacilglicerol (DAG) el cual activa a la proteína cinasa C (PKC), que a su vez activa la vía de las proteínas cinasas Raf-1, que resulta en la fosforilación de la proteína cinasa cinasa mitógeno activada (MEPK), activando a la p42 y p44 mapk. La fosforilación de la fosfolipasa A2 (PLA2) permite liberar más ácido araquidónico (AA). Por otro lado, la vía de p44 y p42 activan la vía extracelular de señales a través de su translocación al núcleo y la fosforilación de varios factores de transcripción (c-fos, c-jun: AP-1: Proteína activante 1, ERK: Cinasa regulada por la señal extracelular). Estos llevan a la activación de la vía de apoptosis Fas y Fas ligando (FasL) que, a su vez, activan las caspasas 8 y 3 (Cp8 y Cp3). Por otro lado, el calcio liberado por IP3 induce a cinasa de miosina de cadena ligera uterina que activa la vía de MAPK en células endometriales. Basado en Cohen 1997; Ohmichi *et al.* 1997; Rueda *et al.* 1999; Chen *et al.* 1998; Wu y Wiltbank, 2001; Davis y Rueda, 2002; Yadav *et al.* 2005; Mao *et al.* 2013; Talbot *et al.* 2017.

Los estados de alta o baja afinidad del FP en el cuerpo lúteo ovino se basan en la afinidad de la unión a la membrana celular (Custer *et al.* 1995). A pesar de que las prostaglandinas pueden unirse a receptores para otras prostaglandinas, la afinidad es diferente. El FP lúteo se une a la  $PGF2\alpha$  >  $PGD2$  (DP, con alta afinidad) >  $PGE2$  (EP1 u EP3, con moderada afinidad) (Woodward y Lawrence 1994; Breyer *et al.* 2001). En los rumiantes, la membrana plasmática de las células del cuerpo lúteo contiene el FP de alta afinidad. La unión de la  $PGF2\alpha$  con su receptor resulta en la activación de la proteína  $G\beta\gamma$  (Guo *et al.* 2015). La  $PGF2\alpha$  estimula la actividad de la fosfolipasa C (PLPC) en las células lúteas grandes y en las células lúteas pequeñas, a pesar de que sólo las células lúteas grandes parecen ser susceptibles a la acción luteolítica de la  $PGF2\alpha$  (Davis *et al.* 1988). Como resultado de la activación de la PLPC, La  $PGF2\alpha$  provoca un rápido y sostenido incremento en los niveles de inositol mono, di y trifosfato (IP, IP2, IP3, respectivamente) en las células lúteas pequeñas (Davis *et al.* 1987; 1988). En células endometriales, a partir de la proteína Gq, la vía de señalización se dirige a PLC, PKC y movilización de calcio intracelular, activación de la cinasa de calmodulina/ $Ca^{2+}$ . Mientras que la subunidad Gi está asociada con la activación de Ras-Raf-1-MEPK-MAP (Ohmichi *et al.* 1997). La activación de la fosfolipasa C resulta en la división de fosfolípidos conteniendo inositol en dos segundos mensajeros: el inositol trifosfato y el diacilglicerol. El primero libera  $Ca^{2+}$  a partir del retículo endoplásmico y el segundo activa a la proteína cinasa C. Esta proteína activa a la MAP cinasa a través del Raf (MAP cinasa cinasa cinasa) y de la MEK1 (MAP cinasa cinasa), vía conocida como “cascada de señalización Raf/MEK/MAP cinasa” (revisado por Bos *et al.* 2004). Los eventos iniciales llevan a la activación de la cascada de señalización de la MAPK, que incluye al ERK, p38 MAPK (p38) y el JNK. La activación del ERKs fue esencial para la función de supervivencia y del JNKs para la muerte celular. Es responsable de la fosforilación y activación de *c-jun*, que junto con *c-fos*, forman parte del factor de transcripción de la AP1 (Guo *et al.* 2015). La  $PGF2\alpha$  también puede activar otros miembros de la familia MAP cinasa y la proteína cinasa activada por estrés (SAPKs, por sus siglas en inglés) (Bos *et al.* 2004).

El tratamiento con  $PGF2\alpha$  induce la activación de la señalización con la MAPK y el incremento en la activación del ERK y el JNK precede el incremento en la expresión del factor de transcripción activante 3 (ATF3) en el núcleo de las células lúteas grandes dentro del cuerpo lúteo bovino (Mao *et al.* 2013). De igual manera, el tratamiento con  $PGF2\alpha$  induce un incremento en la fosforilación del ERK, el cual se correlaciona con el incremento en la expresión de la ATF3 y la disminución en las concentraciones de progesterona en la rata (Ohmichi *et al.* 1997). Por otro lado, la  $PGF2\alpha$  induce la expresión del Nurr77, el cual activa a la enzima  $20\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $20\alpha$ -HSD). De

la misma manera, la acción de la PGF2 $\alpha$  incrementa el Ca<sup>2+</sup>, el cual a su vez activa al ERK1/2, lo que lleva a la activación del JunD (Stocco *et al.* 2002).

### **3.6. Sistema de autoamplificación**

La administración de PGF2 $\alpha$  provoca una rápida disminución en la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo, así como un incremento en la secreción de oxitocina y en los niveles de COX-2 (Hayashi *et al.* 2003). La figura 8 muestra el sistema de amplificación de la PGF2 $\alpha$ . Dicho sistema de autoamplificación tiene como característica que cantidades muy pequeñas de la PGF2 $\alpha$  son suficientes para iniciar el proceso de luteólisis (Tsai y Wiltbank, 1997). Wade y Lewis (1996) indicaron que después de la administración de PGF2 $\alpha$  exógena se estimula la producción endógena de la misma hormona mediante un mecanismo dependiente de la dosis. En ovejas, el mecanismo de autoamplificación se lleva a cabo en conjunto con la oxitocina, la cual estimula la secreción uterina de PGF2 $\alpha$ . Sin embargo, también existe retroalimentación positiva en las células lúteas grandes del ovino, en las que la PGF2 $\alpha$  induce la producción intraluteal de la PGF2 $\alpha$  como resultado de la inducción de la COX-2 (Tsai y Wiltbank, 1997; Wu y Wiltbank, 2001).

Durante la luteólisis natural, la síntesis de PGF2 $\alpha$  uterina se incrementa por la retroalimentación positiva entre la PGF2 $\alpha$  uterina y la oxitocina luteal, mecanismo que se refuerza por la estimulación de la PGF2 $\alpha$  hacia oxitocina. Duong *et al.* (2012) encontraron que la inyección de cloprostenol incrementa los niveles de PGF2 $\alpha$  de manera transitoria en la vena uterina, pero no en la vena ovárica, por lo que sugieren que sería el útero, más que el ovario, el que incrementa la producción de la PGF2 $\alpha$  en respuesta a la inyección de PGF2 $\alpha$  exógena. Durante la luteólisis natural de la oveja cada cuerno uterino secreta 25  $\mu$ g/min/h de PGF2 $\alpha$  hacia la vena uterina, cantidad que al infundirse directamente dentro en la arteria ovárica ocasionó luteólisis (McCracken *et al.* 1972). La infusión de 10  $\mu$ g/min/h disminuyó en un 20% las concentraciones de progesterona (McCracken *et al.* 2012). La infusión de 20  $\mu$ g/min/h dentro de la circulación sistémica, permite que suficiente PGF2 $\alpha$  escape de la degradación pulmonar, y permite una declinación transitoria de las concentraciones de progesterona semejante a la que ocurre al inicio de la luteólisis natural en la oveja (McCracken *et al.* 2012). Esta disminución inicial en las concentraciones de progesterona induce el primer pulso endógeno de PGF2 $\alpha$ . La dosis mínima infundida que ocasionó luteólisis fue de 1  $\mu$ g/h por 6 horas (McCracken, 1971).

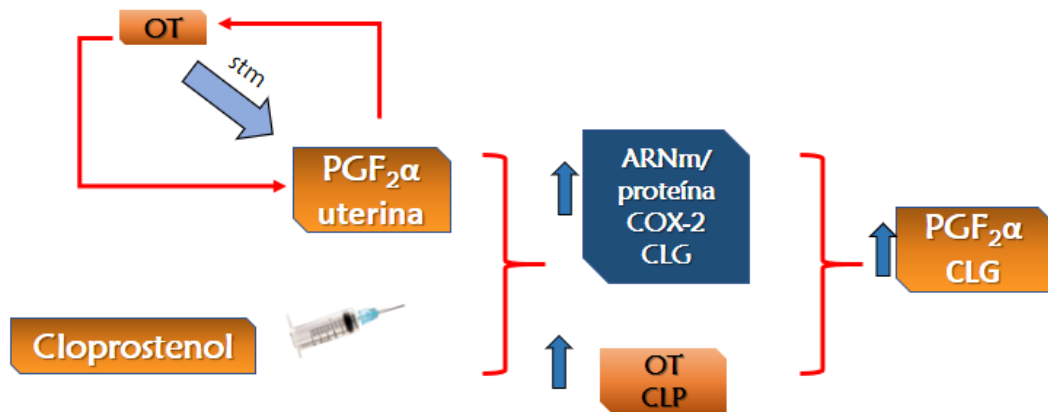


Figura 8. Mecanismo de autoamplificación de la PGF<sub>2</sub>α. stm: Estimula. Flechas azules: aumento. Siglas: COX-2: Ciclooxigenasa-2, CLG: Células lúteas grandes, OT: Oxitocina, CLP: Células lúteas pequeñas. Basado en Tsai y Wiltbank, 1997; 1998.

El mecanismo de autoamplificación también se ha documentado en otras especies. En yeguas la PGF2 $\alpha$  incrementa la expresión de la COX-2 (Kozai *et al.* 2016). En la cerda también se ha documentado (Diaz *et al.* 2002).

El mecanismo de autoamplificación es dependiente de la dosis. Si la PGF2 $\alpha$  causa luteólisis directamente, la dosis mayor podría ser más eficaz que la menor (Wade y Lewis, 1996).

Por otro lado, los efectos de la PGF2 $\alpha$  son rápidos y transitorios en activar la vía de señalización Raf/MEK/MAPK (Chen *et al.* 1998).

### **3.7 Metabolismo de la PGF2 $\alpha$**

Debido al metabolismo pulmonar, la vida media de la PGF2 $\alpha$  en vaquillas es de 29 seg (Shrestha *et al.* 2012) a un minuto (Oliw *et al.* 1983; Wade y Lewis, 1996). Existen tres enzimas que metabolizan a la PGF2 $\alpha$ : 15-hidroxiprostaglandina deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> (PGDH), carbonil reductasa dependiente de NADPH y el citocromo P450-dependiente de prostaglandina  $\Omega$  o 20-hidroxilasa (Okita y Okita, 1996). Debido a que el catabolismo de las prostaglandinas en los pulmones es muy rápido y eficiente (Shrestha *et al.* 2012), el mecanismo a contracorriente le permite a la PGF2 $\alpha$  llegar de manera directa al ovario sin pasar por la circulación general (Senger *et al.* 2003). De hecho, el 99% de la PGF2 $\alpha$  secretada por el endometrio es catabolizada después del primer pasaje por la circulación pulmonar (Davis *et al.* 1980, citado por McCracken *et al.* 1999). En efecto, la fuerte expresión de las PGT en el pulmón sugiere que puede jugar un papel en la remoción de la prostaglandina a través del lecho vascular. El metabolismo de las prostaglandinas es mediado por 15-hidroxiprostaglandina deshidrogenasa (PGDH), la cual cataliza la conversión de la prostaglandina a su metabolito inactivo 15-ceto,13-14-dihidro-PGF2 $\alpha$  (PGFM) (Silva *et al.* 2000). La rápida depuración de la PGF2 $\alpha$ , indica un metabolismo rápido después de un tratamiento con PGF2 $\alpha$ , lo cual se expresa en un incremento en las concentraciones de PGFM en tan solo 2 minutos (Shrestha *et al.* 2012). Posteriormente, las concentraciones del PGFM disminuyen rápidamente a niveles basales una hora después de la inyección de PGF2 $\alpha$ , cuando se elevan las concentraciones de un segundo metabolito, el 11-ketotetranor-PGF2 $\alpha$ , que se forma a partir del PGFM (Granström y Kindahl, 1982). La PGDH y la PGT se requieren para la oxidación de la prostaglandina (Nomura *et al.* 2004). Dicha proteína transportadora de prostaglandina puede ser regulada por las proteínas cinasa (PK) A y C, las cuales regulan el influjo de la PGF2 $\alpha$  (Banu *et al.* 2008). Schuster (2002) explica que el influjo de prostaglandinas en las células podría ser menor que el eflujo. Debido a que los metabolitos no son sustratos, presumiblemente efluyen desde el citoplasma por difusión simple. Además, las

prostaglandinas se reabsorben en las células que las sintetizan, evento mediado por las PGT (Schuster, 2002).

#### **4. EFECTOS DE LA PGF<sub>2</sub> $\alpha$ : LUTEÓLISIS**

El siguiente análisis fue realizado con estudios en los cuales se indujo la luteolisis. Ginther (2013) menciona en una interesante revisión que generalmente se usa el control artificial del ciclo estral o de la ovulación con el objetivo de estudiar eventos naturales. Esto conlleva a un potencial error, ya que la demostración estadística de que la sincronización no afecta eventos subsecuentes no garantiza que las diferencias no ocurran. Debido a que la mayoría de la información disponible está basada en resultados de la luteólisis inducida, se puede asumir que los eventos relatados a continuación ocurren también de manera natural, a pesar de que “la naturaleza guarda sus secretos” (Ginther, 2013). De todas maneras, en lo posible, se detallará cuando los efectos que se reporten sean de naturaleza inducida.

Después de la ovulación el cuerpo lúteo es capaz de presentar un crecimiento exponencial, durante el cual produce tanto factores luteotróficos como luteolíticos. Meidan y sus colaboradores (2005) hacen mención del balance entre estos factores del cuerpo lúteo como “el yin y yang,” en referencia a las células endoteliales, sin embargo, las células lúteas grandes y pequeñas no están ajenas a este término. Dependiendo del desarrollo del cuerpo lúteo, los factores pro y anti luteolíticos producidos por las células lúteas son capaces de realizar cambios tanto en la morfología como en el funcionamiento celular. Los factores generados desde una pequeña glándula transitoria son capaces de propagar sus efectos de manera autocrina, parácrina y endócrina a otras células y/o glándulas, y pueden transformarlas funcional y estructuralmente.

##### ***4.1. Luteólisis funcional y estructural***

La regresión del CL es definida como el proceso mediante el cual el cuerpo lúteo reduce su función, disminuye su volumen, y desaparece del ovario. La regresión del cuerpo lúteo está compuesta por dos tipos de regresión: funcional y estructural. La primera se caracteriza por una reducción rápida en los niveles de progesterona tanto en el tejido lúteo como en la circulación. La luteólisis estructural ocurre como consecuencia de la muerte celular apoptótica (Yadav *et al.* 2005; Sugino, 2006).

##### ***4.1.1 Efectos de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$ que llevan a la luteólisis funcional***

Schams y Berisha (2004) describieron la cronología de la cascada luteolítica, dividiéndola en dos fases, funcional (aparentemente ocurre en menos de 12 horas) y estructural (que ocurre posterior a

las 12 horas del inicio de la luteólisis). La luteólisis funcional se caracteriza por una rápida caída en las concentraciones de progesterona, mientras que la estructural se refiere a la disminución del tamaño y la capacidad esteroidogénica de las células lúteas grandes y pequeñas (Hayashi *et al.* 2003). La luteólisis funcional comienza en el ovino en promedio en el día 13 del ciclo estral en respuesta a los primeros pulsos de secreción de la PGF2 $\alpha$  (Zarco *et al.* 1988a). Los pulsos de PGF2 $\alpha$  que se secretan en forma frecuente entre el día 14 y 16 del ciclo (Zarco *et al.* 1988a), inducen la luteólisis estructural. Para que pueda llevarse a cabo la luteólisis se requiere de la disminución en las concentraciones de progesterona (Madore *et al.* 2003). El estudio de Hayashi *et al.* (2003) comprueba este efecto, ya que la inyección de cloprostenol genera, dentro de las primeras 4 horas, la disminución de las concentraciones de progesterona y un incremento agudo en la liberación de oxitocina y PGF2 $\alpha$ . Dichos autores sugieren la posibilidad de que el incremento en la producción lútea de PGF2 $\alpha$  puede indicar el comienzo de la luteólisis estructural, más que de la funcional. Las concentraciones de progesterona disminuyen significativamente a las 4 horas después de la inyección con PGF2 $\alpha$ , mientras que a las 24 horas la progesterona se redujo a niveles basales pero el peso del cuerpo lúteo no cambió todavía (Vonnahme *et al.* 2006).

Una de las acciones de la PGF2 $\alpha$  es la inhibición de la esteroidogénesis. Sus acciones pueden ser de manera directa ya que al administrar una dosis de PGF2 $\alpha$  el ARNm para 3 $\beta$ -HSD disminuye significativamente a las 12 h (durante el desarrollo de la luteólisis funcional), sin embargo, la actividad de la enzima no declina hasta 24 horas después del tratamiento (Rodgers *et al.* 1995). Para las 24 h post-inyección, cuando ya está iniciando la luteólisis estructural, los niveles de la enzima disminuyen al 10 y el 20% (Levy *et al.* 2000), por lo que la síntesis de progesterona intralútea disminuye al 20% después de 20 horas (Hayashi *et al.* 2003), mientras que las concentraciones de progesterona en suero disminuyan a niveles basales a las 24 h después del tratamiento (Turzillo *et al.* 1995). La disminución en las concentraciones de progesterona intralútea se correlaciona con la luteólisis funcional (Hayashi *et al.* 2003). La disminución gradual y temprana de las concentraciones de progesterona (Berisha *et al.* 2010) coincide con el incremento en el índice de Bax-Bcl-2 y caspasas, dentro del período de luteólisis funcional (Yadav *et al.* 2005). Sin embargo, aunque las concentraciones del ARNm que codifica a estas enzimas pueden disminuir en respuesta a PGF2 $\alpha$ , no lleva a una reducción rápida en las concentraciones de las enzimas, que es lo que realmente causara una disminución en las concentraciones de progesterona (Rodgers *et al.* 1995). A la par, la esteroidogénesis se mantiene parcialmente, ya que el tratamiento con PGF2 $\alpha$  inhibe la producción de progesterona por las células lúteas grandes, pero no por células lúteas pequeñas (Diaz *et al.* 2002) por lo que en este periodo sigue habiendo la presencia de ciertos niveles de progesterona. Tres horas



después de haberse reducido significativamente la progesterona, el porcentaje de células lúteas grandes que responden a  $\text{PGF2}\alpha$  incrementa (Davis *et al.* 2010).

En ovinos, el efecto indirecto de la  $\text{PGF2}\alpha$  rápidamente estimula la expresión de la ET-1 en el cuerpo lúteo (Levy *et al.* 2000; Hinckley y Milvae, 2001). Se ha reportado que el receptor de la ET-1, la ETA, media las acciones antiesteroideas de la ET-1 como mediador de la  $\text{PGF2}\alpha$  (Doerr *et al.* 2008). Cabe recalcar que el cuerpo lúteo solo responde a la  $\text{PGF2}\alpha$  cuando se sintetiza la ET-1 de manera ininterrumpida (Meidan y Levy, 2002). Weems *et al.* (2009) abordó este tema, e indicó que la ET-1 incrementa el índice de  $\text{PGE}_2$ :  $\text{PGF2}\alpha$ . Las células endoteliales son el principal sitio para la síntesis de la ET-1 y el ON en el cuerpo lúteo. Por otro lado, la administración de un análogo de la  $\text{PGF2}\alpha$  reduce el ARNm de NOS en un 15% de sus concentraciones anteriores, lo que permite un incremento en la ET-1 durante la luteólisis (Rosiansky-Sultan *et al.* 2006).

Por otro lado, la  $\text{PGF2}\alpha$  tiene otra vía indirecta para disminuir las concentraciones de progesterona. Madore *et al.* (2003) proponen un papel para una enzima, la AKR1B5 que se expresa en el endometrio durante la luteólisis. La AKR1B5 incrementa justo cuando las concentraciones de progesterona están al máximo, por lo que Madore *et al.* (2003) suponen un nexo entre los dos. Al mismo tiempo, la AKR1B5 inactivará a la progesterona transformándola en  $20\alpha$ -hidroxiprogesterona, por lo que disminuye la concentración local de progesterona. La habilidad de combinar dos funciones de transformación ( $\text{PGH}_2$  a  $\text{PGF2}\alpha$ ) así como la inactivación de la progesterona, hace a la enzima AKR1B5, una enzima multifuncional (Madore *et al.* 2003). En contraste, Arosh *et al.* (2004) reportan que el incremento en la concentración intralútea de progesterona podría bloquear la actividad de la AKR1B5. Es posible que cuando la  $\text{PGF2}\alpha$  de origen endometrial inicia la luteólisis funcional, la disminución en las concentraciones de progesterona podría permitir que la AKR1B5, a su vez, disminuya más los niveles de la progesterona. Con esto la oxitocina se podría unir a su receptor y provocar un incremento en la producción de la  $\text{PGF2}\alpha$  de origen lúteo. Por otro lado, la  $\text{PGF2}\alpha$  mejora la actividad de la enzima  $20\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, la cual cataboliza la progesterona a  $20\alpha$ -hidroxiprogesterona (Kato *et al.* 1997). Además, induce la expresión de Nur77, el cual estimula de manera transcripcional a la enzima  $20\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, provocando la disminución de la progesterona en suero (Stocco *et al.* 2000). Es posible que las altas concentraciones de progesterona entonces, puedan ser un mecanismo de protección para el cuerpo lúteo.

#### *4.1.2. Efectos de la $\text{PGF2}\alpha$ que llevan a la luteólisis estructural*

La  $\text{PGF2}\alpha$  induce factores que llevan a la apoptosis celular en pocas horas, tanto durante la luteólisis espontánea como en la inducida mediante la administración exógena de la hormona. La figura 9

muestra dos vías para llevar a cabo la apoptosis. Los cambios específicos que se generan en las células lúteas después de la luteólisis natural o inducida se puede revisar en Corteel (1975). La vía extrínseca o de receptores de muerte es la que inicia tempranamente luego de una dosis de  $\text{PGF2}\alpha$ . Los niveles de las proteínas Fas, Bax y caspasa-3 están elevados durante el diestro, mientras que FasL y Bcl-2 fueron mayores durante la fase lútea temprana y disminuye posteriormente (Slot *et al.* 2006). El ARNm para caspasas-3 en el cuerpo lúteo de los días 12 o 14 del ciclo estral incrementa después de la  $\text{PGF2}\alpha$  (Rueda *et al.* 1999). La expresión de Fas no se observa en las células lúteas pequeñas durante la fase lútea temprana, pero su receptor es evidente en la fase lútea media (Davis y Rueda, 2002).

Una vez que se secreta  $\text{PGF2}\alpha$  endógena o se administra de manera exógena, se produce un incremento transitorio en las concentraciones de COX2 (Tsai *et al.* 2001).

La  $\text{PGF2}\alpha$  provoca un incremento en el índice de Bax-Bcl-2, y en la caspasa 9 y -3 en tejido lúteo a las 4 hrs post-tratamiento hasta las 18 h, a lo cual se sumó un incremento en la expresión de FasL y Fas a 18 horas, acompañado por una inducción significativa en la actividad de las caspasas 8 (Yadav *et al.* 2005).

La vía intrínseca se produce a través de estímulos no mediados por receptores y son eventos iniciados en la mitocondria, por eso también se conoce como vía mitocondrial (Figura 10). En la amplia revisión de Elmore (2007) se muestra con detalle. Una vez que se ha iniciado esta vía, se incrementa la permeabilidad en la membrana mitocondrial, por lo que se pierde el potencial de membrana y se abren canales de calcio, que permiten su salida hacia el citoplasma. Esto provoca la activación de factores pro-apoptóticos. La salida de citocromo C de la mitocondria hacia el citosol permite que dicho citocromo se una y active al Apaf1 (factor activante de proteasas apoptóticas), activando a pro-caspasa-9 y Smac/DIABLO (inhiben la proteína inhibidora de apoptosis). Por otro lado, se activan el factor que induce apoptosis (se transloca al núcleo causando fragmentación de ADN), endonucleasas que también se transloca al núcleo donde divide la cromatina nuclear y CAD (una ADNasa activada por caspasas).

Estos eventos mitocondriales apoptóticos son regulados por miembros de la familia Bcl-2 /proteína 2 de las células B del linfoma), los cuales gobiernan la permeabilidad de la membrana mitocondrial. De esta familia hay miembros anti (Bcl2, BclX, BclXL y X5) y pro (Puma, Bcl10, BAX (proteína X asociada a Bcl2), Bad (antagonista de Bcl2), Bik (proteína asesina), Hrk (Harakiri, Hutt, 2015). El principal mecanismo de acción es la regulación del citocromo C que se libera de la mitocondria por la alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

Los procesos reproductivos llevan a cambios dinámicos en el metabolismo y consumo de energía. La vía intrínseca se produce por incremento en radiación, toxinas, hipoxia, o estrés oxidativo. Ambas vías pueden unirse y las moléculas de una vía pueden influenciar a otras. En esta vía, las células que viven bajo condiciones aeróbicas siempre tendrán una paradoja con el oxígeno. El oxígeno es necesario para que las células se mantengan con vida, pero las especies reactivas al oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), como los radicales de superóxido, hidroxilo y peróxido de hidrógeno son generados a partir de dicho oxígeno y de células dañadas (Sugino, 2006). Dado que el cuerpo lúteo produce progesterona, en conjunto con las reacciones de las enzimas P450, puede ser responsable de la excesiva producción de radicales libres (oxidantes) que son generados durante los procesos fisiológicos de consumo de oxígeno (Rizzo *et al.* 2012). Por lo anterior, el tejido está bajo continuo estrés oxidativo por la generación de ROS como un bioproducto (Fujii *et al.* 2005). El ovario es un órgano activo metabólicamente, en el que normalmente las ROS y los antioxidantes permanecen en equilibrio. Cuando este equilibrio se interrumpe a consecuencia de una sobreproducción de ROS y el cuerpo no lo elimina, o hay sobre agotamiento de antioxidantes (los cuales convierten el peróxido de hidrógeno en agua, para evitar la potencial toxicidad de ROS), se produce estrés oxidativo (Talukder *et al.* 2017), con lo cual ROS induce la muerte celular por apoptosis durante la luteólisis (Rizzo *et al.* 2012).

Dentro de la función lútea, la LH incrementa la producción de ROS, las cuales, a su vez, inhiben la actividad enzimática del citocromo P450<sub>scc</sub>. Además, la administración de la PGF2 $\alpha$  incrementa la generación de las ROS y viceversa. La progesterona en cambio disminuye la producción de ROS (Kato *et al.* 1997). El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) también interfiere con la producción basal de esteroides (Vega *et al.* 1995).

#### 4.1.2. 1. La vía de ejecución de la apoptosis

El tratamiento con PGF2 $\alpha$ , independientemente de la vía (extrínseca o intrínseca) que tome, incrementa la expresión y la actividad de las caspasas (Rueda *et al.* 1999). Las caspasas son sintetizadas como pro-enzimas inactivas, que son activadas posteriormente por la división de residuos de aspartato. Según Cohen (1997), existen diez caspasas las cuales se han categorizado de acuerdo con su función durante el camino hacia la muerte celular. Las iniciadoras (Caspasa -2, -8, -9, -10), las efectoras o ejecutoras (caspasa -3, -6, -7), y las inflamatorias (caspasas -1, -4, -5). Específicamente la caspasa-8 es activada por CD95 y TNF, la cual, al igual que la caspasa-10 pueden dividirse en otras caspasas. El CD95 y el receptor TNF (TNFR-1) son miembros de la familia de receptores de factores

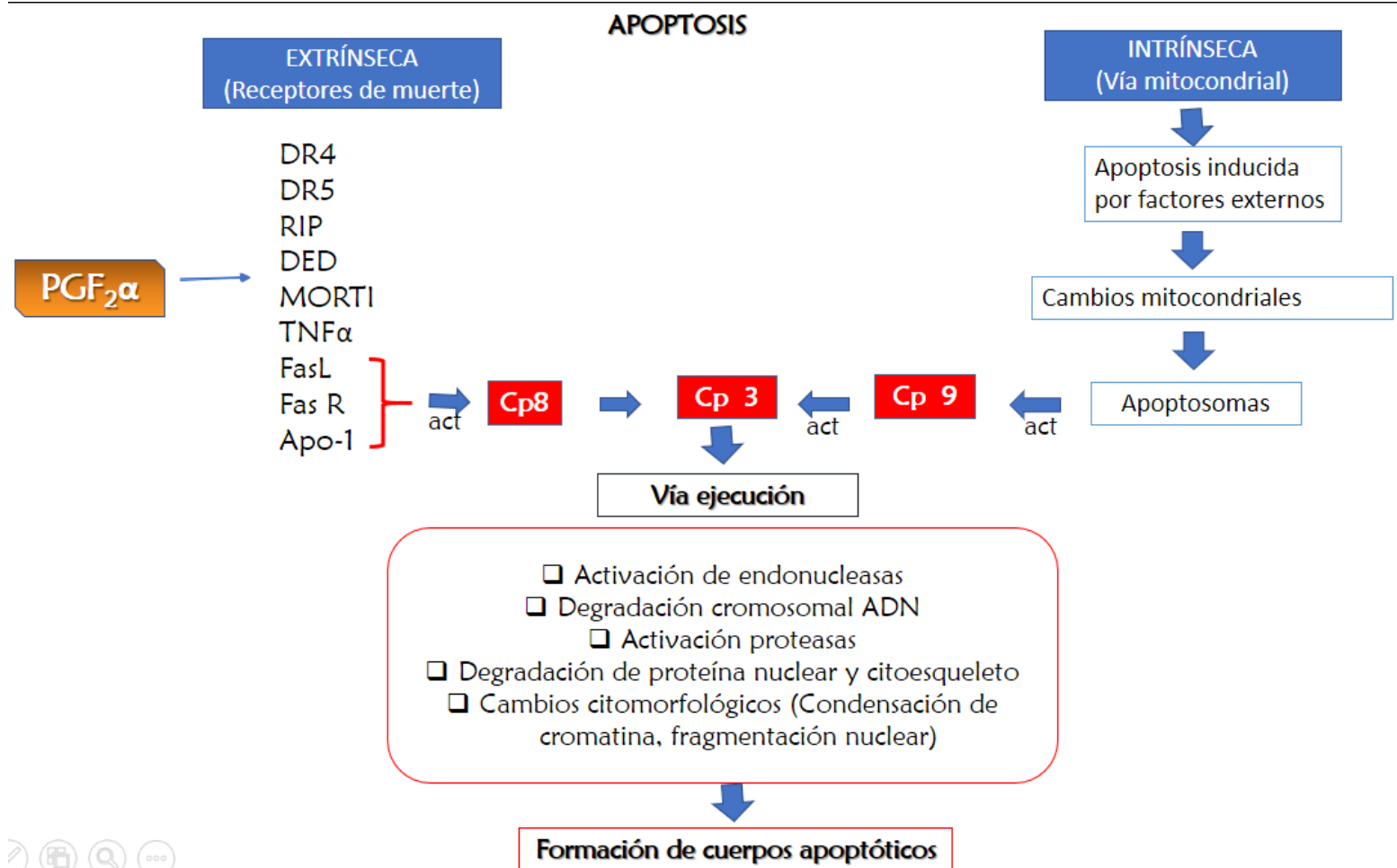


Figura 9. Mecanismo de apoptosis. La vía extrínseca, en la cual intervienen los receptores de muerte (DR4, DR5), RIP: Proteínas de interacción con receptores, DED: dominio efector de muerte, MORT1: complejo de receptor de muerte Fas, TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , Fas y Fas ligando (FasL), caspasa 8,9 y 3 (Cp8, Cp9 y Cp3). APO: Proteína Activante 1 Basado en: Cohen, 1997; Kumar, 1997; Elmore, 2007.

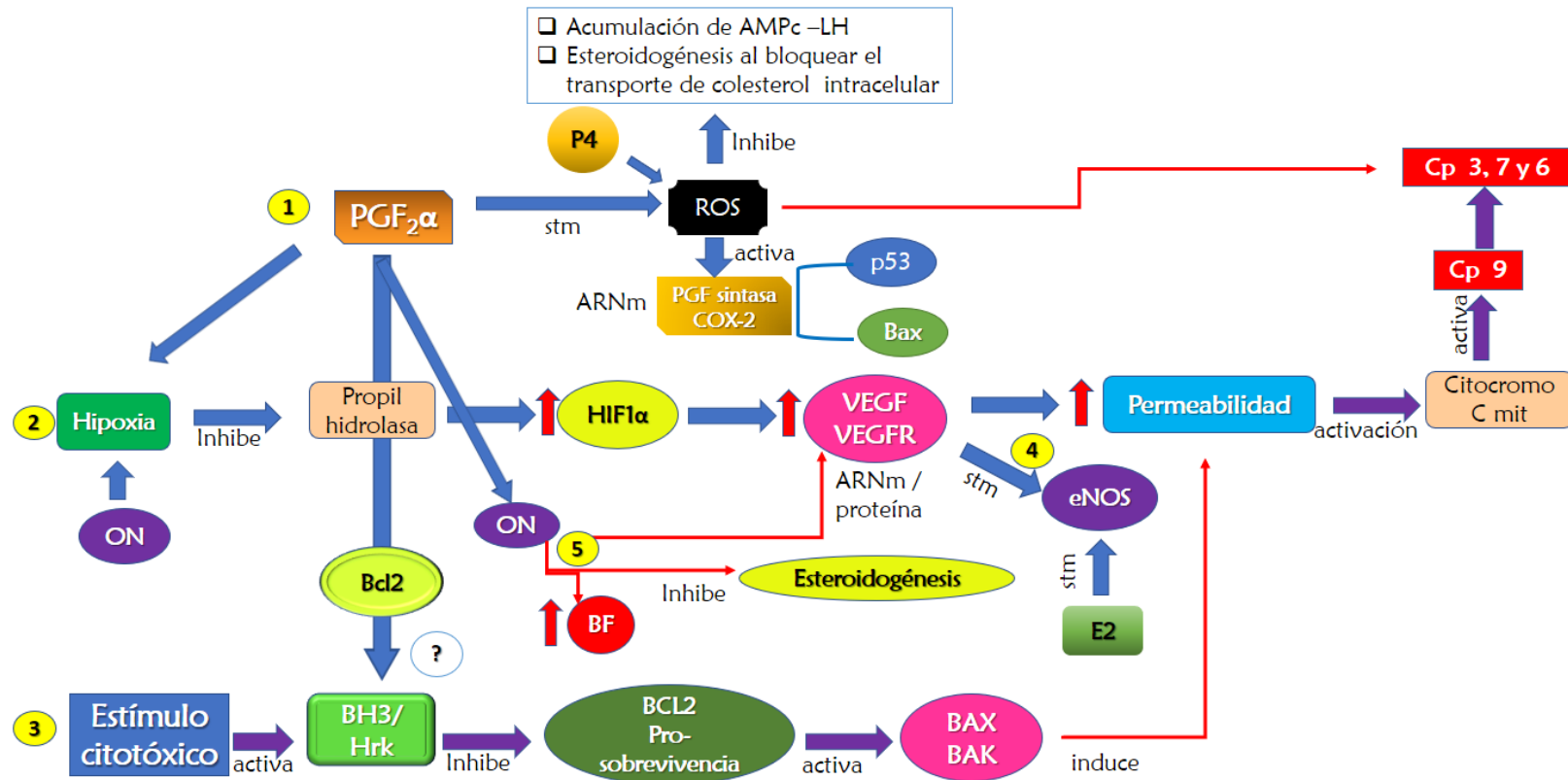


Figura 10. Efectos de la  $PGF_2\alpha$  a través de la vía intrínseca de apoptosis. La  $PGF_2\alpha$  actúa a través de diferentes vías para llevar a la vía de apoptosis. Referirse al texto. Siglas: stm: estimula, P4: progesterona, ROS: especies reactivas al oxígeno, COX-2, ciclooxigenasa, HIF1 $\alpha$ : factor inducible a la hipoxia 1, VEGF y VEGFR: factor de crecimiento vascular endotelial y su receptor, respectivamente, Mit: mitocondrial, Cp3,6,7,9: caspasas 3,6,7 Y 9, eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial, ON: óxido nítrico, BF: flujo sanguíneo, BH3 o Hrk: harakiri. Basado en: Nishimura y Okuda, 2010; Reynolds *et al.* 2000; Kim *et al.* 2009; Hagen *et al.* 2003; Hutt, 2015.

de crecimiento del nervio y comparten una región de identidad llamada el “dominio de muerte”, requerida para la señal de apoptosis (Cohen, 1997).

Las caspasas iniciadoras, como las caspasas 8, 9 y 10 son las que activan a las caspasas de ejecución. La pro-caspasa-8, 9 y 10 son caspasas iniciadoras. La pro-caspasa 8 se libera del complejo señalizador que induce a la muerte (Fas, FasL, FADD y pro-caspasa 8) en el citoplasma, donde activa a caspasa 3 (García-Robles *et al.* 2009, Kawaguchi *et al.* 2013). La caspasa 3 induce la reorganización del citoesqueleto y la desintegración de las células en cuerpos apoptóticos, activa a endonucleasas específicas (CAD) (Elmore, 2007).

#### *4.1.3. Efecto de la PGF2 $\alpha$ : Flujo sanguíneo*

Los efectos iniciales de ambos tipos de luteólisis (espontánea o inducida) se observan con mayor énfasis en el flujo sanguíneo. Durante la luteólisis espontánea, la oxitocina, el estradiol y la disminución en las concentraciones de progesterona que se observan durante la fase lútea tardía estimulan la secreción de pulsos de PGF2 $\alpha$ . El estudio de Niswender *et al.* (1976), muestra una relación positiva significativa entre progesterona y flujo sanguíneo en el ovario en ovejas durante la fase lútea media. El efecto de la PGF2 $\alpha$  sobre el cuerpo lúteo fue observado por Acosta *et al.* (2002). Ellos encontraron que el flujo sanguíneo incrementa dentro de las primeras horas después del tratamiento con cloprostenol, y disminuye 4 h después.

La PGF2 $\alpha$  estimula de manera aguda la expresión de la ET-1, la ACE, la eNOS e iNOS (Miyamoto *et al.* 2009) en paralelo con el flujo sanguíneo. Esto se debe a que, al estimularse el ON, provoca vasodilatación en las arteriolas que rodean al cuerpo lúteo, provocando un aumento en el flujo sanguíneo (Miyamoto *et al.* 2005) (Figura 11 y 13). Simultáneamente, la PGF2 $\alpha$  uterina o inducida, incrementa la ET-1 y la ANgII provenientes de las células endoteliales dentro del cuerpo lúteo, suprimiendo la secreción de la progesterona (Miyamoto *et al.* 2005; 2009). Posteriormente, en el día 19 en el bovino disminuye la progesterona y la eNOS regresa a su estado basal, pero la ET-1 y la ACE permanecen altas, y la COX2 incrementa (Miyamoto *et al.* 2005). Por lo anterior, es posible que ocurran incrementos en las concentraciones de ON con cada pulso secuencial de PGFM antes y durante la luteólisis, mientras que la LH se relaciona con el restablecimiento de las concentraciones de progesterona (Greene y Ginther, 2015).

Durante la luteólisis o la administración intrauterina de la PGF2 $\alpha$  se redujo el flujo sanguíneo al ovario en ovejas (Nett *et al.* 1976). Después de un incremento inicial, el componente endotelial del lecho vascular disminuye durante la regresión lútea inducida por PGF2 $\alpha$  (Vonnahme *et al.* 2006).

El tratamiento con PGF2 $\alpha$  incrementa de manera transitoria el ARNm para el VEGF, la angiopietina, el FGF y el NOS desde las 4 y 12 horas post-inyección (Vonnahme *et al.* 2006). Durante la fase lútea en la oveja, el flujo sanguíneo hacia el cuerpo lúteo se incrementa a la par de las concentraciones de progesterona y el volumen del cuerpo lúteo (Acosta *et al.* 2003). Este incremento es importante para la función del cuerpo lúteo y es controlado por varios factores angiogénicos como el VEGF, el FGF, el IGF. Este proceso es regulado por la LH, que activa la metaloproteinasas de la matriz que degradan la matriz extracelular asociada con los vasos sanguíneos. Estimula también el VEGF, un importante estimulador de la proliferación celular endotelial (en la revisión de Messinis *et al.* 2009). La ANG II y la ET-1 estimulan el VEGF y el FGF-2 (revisión de Schams y Berisha, (2004). Las proteínas del VEGF A disminuyen después de 0.5 horas (alrededor del 60%) post-tratamiento con la PGF2 $\alpha$  (Berisha *et al.* 2010). Schams y Berisha, (2004) concluyen que la interrupción del soporte por el VEGF para el CL juega un papel durante la luteólisis estructural, mientras que el FGF's tiene un mayor impacto sobre la luteólisis funcional.

En la revisión de Miyamoto *et al.* (2005) se observa que un cambio en el flujo sanguíneo (incremento de 170-200%) antes de la disminución de progesterona (luteólisis funcional), antecede la luteólisis y se observa tanto en luteólisis espontánea como en la inducida. Shrestha *et al.* (2010) comparó la infusión de la PGF2 $\alpha$  (simulando un pulso natural) con la administración de un bolo intrauterino de la hormona. Algo que fue común en ambos, fue el incremento rápido (10 min) en las concentraciones de progesterona y la disminución de la misma entre una y dos horas después del tratamiento. El incremento en el cortisol, prolactina (6 min) y el flujo sanguíneo incrementando de manera gradual, acompañó al aumento en progesterona inicial, lo que no se observa en el pulso simulado. Igualmente, se han observado diferencias en cuanto a la administración exógena de la PGF2 $\alpha$ .

Los efectos de diversos análogos de la PGF2 $\alpha$ , o de diversas dosis, sobre el flujo sanguíneo y sobre las vías moleculares en el cuerpo lúteo podrían no ser idénticos. A lo largo de los años se han utilizado en la oveja varios tipos de prostaglandinas, el más común es el Dinoprost (Lutalyse) en dosis que van desde 5, 15 y 20 mg a diferentes intervalos de tiempo, desde 8 a 11 días (Godfrey *et al.* 1997; Herrera *et al.* 1990; Hernández *et al.* 2001; Barret *et al.* 2002; Cárdenas *et al.* 2004; Ali *et al.* 2009; Baby y Bartlewski, 2011); en los cuales los resultados han sido variables. De la misma manera, se ha utilizado también cloprostenol, en diferentes dosis que van desde 38,5 hasta 126  $\mu$ g en intervalos desde 7 a 9 días (Contreras-Solís *et al.* 2009 a y b; Olivera-Muzante *et al.* 2011a y b; Fierro *et al.* 2011), con resultados variables en cuanto a la respuesta a la sincronización y la fertilidad.

El-Sherry *et al.* (2013) comparó los efectos de la administración de dinoprost (PGF2 $\alpha$ ) y cloprostenol (análogo) sobre el cuerpo lúteo. No hubo diferencias en la luteólisis, ni en el diámetro del cuerpo

lúteo con ambos grupos, pero si en cuanto al flujo sanguíneo. El nivel del ON y la velocidad del flujo incrementó después del dinoprost, pero disminuyeron en el grupo de cloprostenol en el mismo período de tiempo (30 min) (El-Sherry *et al.* 2013). Sin embargo, McCracken, (1971) reportaron que las altas concentraciones de de la PGF2 $\alpha$  causan un efecto de vasoconstricción.

Por el contrario, los reportes de Acosta *et al.* (2002) y Acosta y Miyamoto, (2004) sugieren que el flujo sanguíneo en el cuerpo lúteo de la fase lútea media incrementó rápidamente después de la administración de cloprostenol. Este aumento inicial puede provocar el inicio de la cascada luteolítica. Sin embargo, ellos describen que este incremento no se observó cuando administraron la cloprostenol durante la fase lútea temprana.

Por el contrario, también se ha reportado que la luteólisis inducida con cloprostenol reduce el ARNm para NOS aproximadamente en un 15 % por 24 horas (Rosiansky-Sultan *et al.* 2006). Cuando la PGF2 $\alpha$  causa la regresión por disminución en el flujo sanguíneo (Nett *et al.* 1976), se produce un estado de hipoxia. Ésta se define como una reducción en el oxígeno disponible en un organismo, tejido o célula (Fadhillah *et al.* 2014) (Figura 10). Los elementos que responden a la hipoxia se reconocen y regulan por el factor inducible a la hipoxia 1 (HIF-1), cuyos genes median la respuesta de adaptación de los tejidos a niveles bajos de O<sub>2</sub> (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$ ) (Kim *et al.* 2009). Esta condición inhibe a la enzima propil hidrolasa (encargada de regular la estabilidad de HIF1 $\alpha$ ), que a su vez ocasiona que el HIF1 $\alpha$  se acumule. Este aumento en HIF1 $\alpha$ , por un lado, activa al gen HIF. Por otro lado, acrecentará el O<sub>2</sub> no respiratorio, que consecuentemente reactivará a la enzima propil hidrolasa, lo que eventualmente dará cabida a un aumento en la disponibilidad del O<sub>2</sub> (Hagen *et al.* 2003). Otra acción del aumento en HIF1 $\alpha$ , es el incremento tanto el ARN mensajero y su proteína (Nishimura y Okuda, 2010), tanto *in vivo* como *in vitro* (Ferrara, 1999). Por otro lado, la expresión del ARNm para HIF1A se detectó durante la fase lútea temprana y tuvo una relación inversa con vasohibinas (Berisha *et al.* 2017).

#### 4.1.4. Caracterizando la secreción pulsátil de la PGF2 $\alpha$

La declinación de las concentraciones de progesterona no es una señal suficiente para incrementar la frecuencia de la liberación de la PGF2 $\alpha$  (Zarco *et al.* 1988a). Sin embargo, sí contribuye a iniciar el proceso de luteólisis y como consecuencia se produce la disminución en las concentraciones de progesterona. Antes del inicio de la luteólisis se presentan dos o tres pulsos de baja frecuencia, con un intervalo interpulso de 13.4 $\pm$ 1.6 horas. Para causar la luteólisis funcional y estructural, es necesario un aumento en la frecuencia de pulsos de la PGF2 $\alpha$ . Con forme se aproxima la luteólisis espontánea (días 14-15), la frecuencia de los pulsos se incrementa durante los 5 o 6 pulsos de PGF2 $\alpha$  endógena



que se secretan en un período de menos de 48 horas para completar la regresión en la oveja (Zarco *et al.* 1988b, McCracken *et al.* 2012). La vida media de la PGF2 $\alpha$  es corta, por lo que su metabolito PGFM es un indicador de la secreción de la hormona luteolítica dentro de la circulación (Kindahl *et al.* 1976). En la oveja, se secretaron en promedio 2.2 pulsos de PGF2 $\alpha$  antes de comenzar la luteólisis, el intervalo entre dichos pulsos fue de 13.4 horas, lo que fue seguido por 6 pulsos secretados en promedio cada 7.9 horas y que coincidieron con la regresión del cuerpo lúteo (Zarco *et al.* 1988b). En bovinos también se producen pulsos de PGF2 $\alpha$  que aumentan su frecuencia conforme se desarrolla la luteólisis (Kindahl *et al.* 1976; Mann y Lamming, 2006).

La figura 11 ilustra los efectos agudos de la PGF2 $\alpha$ . El trabajo de Tsai *et al.* (2001) durante la fase lútea media, muestra que los efectos de la administración de 25 mg de la PGF2 $\alpha$  pueden ser muy rápidos y en un inicio transitorios. La concentración de ARNm para COX2 y *c-fos* aumentan en los primeros 30 minutos post-tratamiento, pero disminuyen en tan sólo 4 horas. Después de una dosis luteolítica de PGF2 $\alpha$ , el FP, 3 $\beta$ -HSD, PLA2c y el receptor para la LH no cambian a la media hora del tratamiento, pero disminuyen a las 4 horas. Únicamente StAR disminuye paulatinamente desde las 0.5 horas. Asimismo, la infusión de 20  $\mu$ g/min/h durante la misma etapa lútea, permite la generación de un pulso de la PGF2 $\alpha$ . Sin embargo, al ser de naturaleza transitoria, se debe requerir de la generación de más pulsos. Esto se logra por los mecanismos de retroalimentación positiva con oxitocina y los mecanismos de autoamplificación de la propia PGF2 $\alpha$ , que ya se han presentado con anterioridad.

En la década del 2010, Ginther y sus colaboradores describieron con detalle los pulsos de la PGF2 $\alpha$ . El período pre-luteolítico se definió de acuerdo con la disminución en la concentración de progesterona individual de cada animal que fue >4ng/mL (Ginther *et al.* 2010a). La hora común entre el final del período pre-luteolítico y el comienzo del luteolítico, se basa en la disminución progresiva de las concentraciones de progesterona y lo designaron como la hora de transición (Ginther *et al.* 2010b). Ellos además describen una supresión transitoria de las concentraciones de progesterona, que ocurre en el pico del último pulso de PGFM pre-luteolítico, el cual es inmediatamente seguido por un restablecimiento. Dicho restablecimiento de la hormona en la hora de transición fue temporalmente asociado con un pulso de la LH. La progesterona rebota por un efecto combinado de un pulso de la LH y la porción descendente del pulso de la PGF2 $\alpha$  (Ginther *et al.* 2011) (Figura 12). Un restablecimiento transicional de progesterona ocurre al final de la pre-luteólisis y el comienzo de la luteólisis y retorna a su concentración original. Durante la luteólisis, la recuperación del nivel de

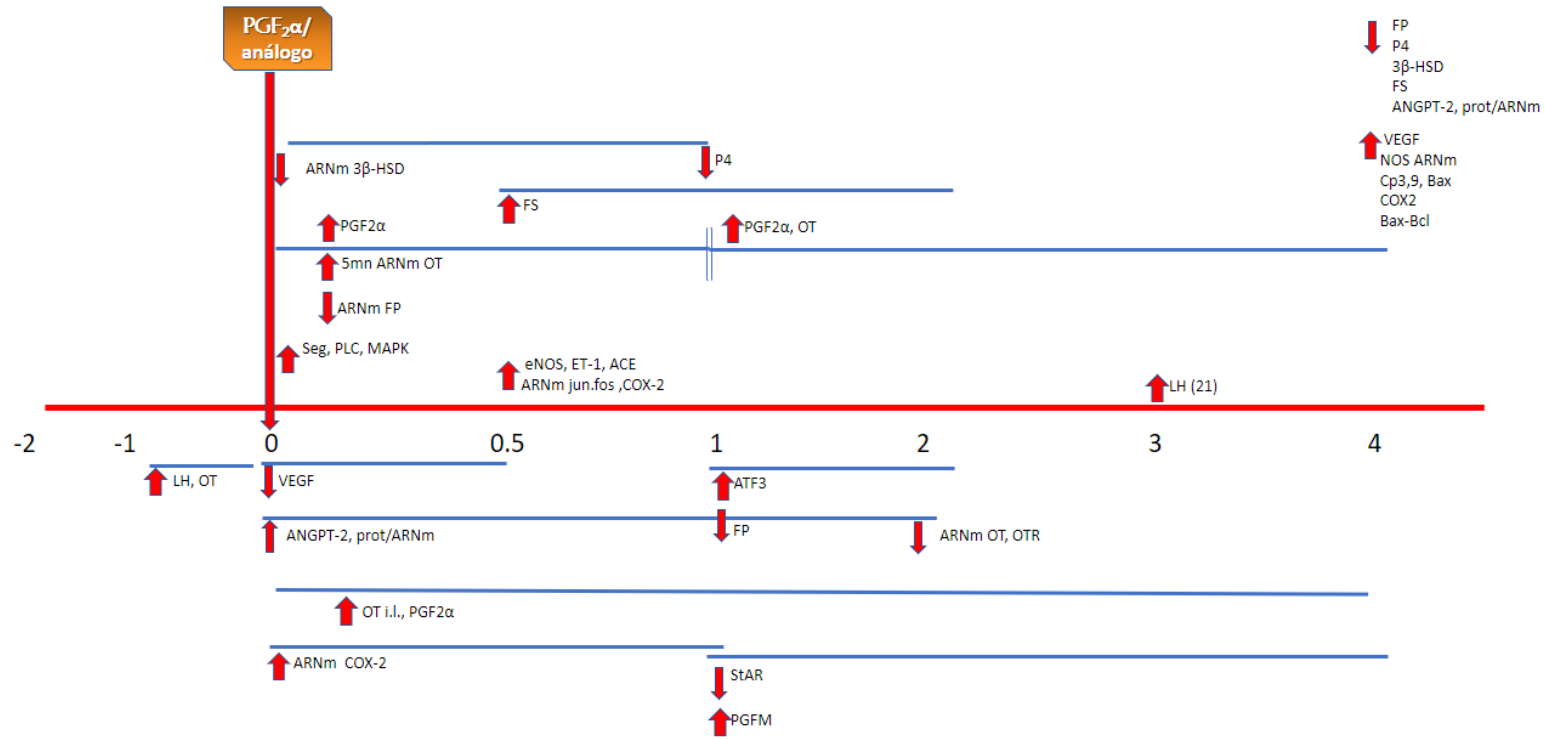


Figura 11. Efectos agudos de la PGF2 $\alpha$ . La línea roja indica las horas antes (-2 y -1) y después (0, 0.5, 1, 2, 3 y 4 horas) del tratamiento con PGF2 $\alpha$ . Las flechas rojas indican el incremento (↑) o disminución (↓) en las concentraciones de los diferentes factores escritos en la figura. Siglas: PGT: Proteína transportadora de prostaglandinas, COX-2: ciclooxigenasa-2, OT: oxitocina, OTR: receptor para oxitocina, PGT: proteína transportadora de prostaglandinas, 3 $\beta$ -HSD: 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, StAR: proteína de regulación esteroideogénica aguda, FS: flujo sanguíneo, MAPK: proteína cinasa mitógeno activada, ACE, enzima convertidora de angiotensinas, i.l: intraluteal, LH: hormona luteinizante, ET-1: endotelina -1, FP: receptor para prostaglandina, PGDH; 15-hydroxyprostaglandina deshidrogenasa, EP-2: receptor para PGE2, ER $\alpha$ : Receptor para estradiol alfa, FS: flujo sanguíneo, ANGPT-2: Angiopoyetina-2, PGFM: 13, 14-dihidro-15-ceto PGF2 $\alpha$ , ATF3: factor de transcripción activante 3, ON: óxido nítrico, NOS: Oxido nítrico sintasa, eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial, Cp: Caspasa. Basado en: Acosta *et al.* 2002; 2003; Acosta y Miyamoto, 2004; Atli *et al.* 2012; Berisha *et al.* 2005; 2010; 2016; Chen *et al.* 1998; Davis *et al.* 2010; Duong *et al.* 2012; Fiedler *et al.* 1999; Ginther *et al.* 2009; Guo *et al.* 2015; Hawkins *et al.* 1993; Hayashi *et al.* 2003; Juengel *et al.* 1998, 2000; Levy *et al.* 2000; Mao *et al.* 2013; Miyamoto *et al.* 2005; 2009; Répasi *et al.* 2005; Schams *et al.* 2001; 2002; 2004; Shirasuna *et al.* 2010a; Shrestha *et al.* 2010; Shrestha *et al.* 2012; Slot *et al.* 2006; Tsai *et al.* 1997; 1998; Tsai *et al.* 2001; Vonnahme *et al.* 2006; Yadav, *et al.* 2005; Tsai y Wiltbank *et al.* 1997; Levy *et al.* 2000.

progesterona es incompleto y mengua gradualmente. Una recuperación parcial durante la luteólisis se asocia con un incremento concomitante en el flujo sanguíneo al cuerpo lúteo (Ginther y Beg, 2012b). Ellos proponen que la luteólisis no comienza en ganado vacuno hasta después de la recuperación transicional (Ginther y Beg, 2012b).

La amplitud de los picos de PGFM fue mayor durante el período luteolítico que en los otros dos períodos (pre y post luteolítico) (Ginther *et al.* 2010a). El final del período luteolítico está marcado por la hora en que las concentraciones de progesterona disminuyen a menos de 1 ng/mL. El período post-luteolítico comienza cuando las concentraciones de progesterona disminuyeron hasta 0.3 ng/ml (Ginther *et al.* 2010a) o < 0.9 ng/ml (Ginther y Beg, 2012a). El intervalo entre picos fue de 8 horas durante el período luteolítico, versus 5.8 horas en el post-luteolítico (Ginther *et al.* 2010a).

Por otro lado, la regulación de la luteólisis en rumiantes involucra hormonas como progesterona, estradiol y oxitocina. Ginther y colaboradores (2010b) asociaron los pulsos de PGFM con diversas hormonas, a partir de dos experimentos. El primero relacionado a la luteólisis temprana, en el que observaron una disminución en las concentraciones de progesterona durante las horas -3 a 0, con una “rebote” o recuperación posterior (incremento temporal) sin regresar a las concentraciones pre-pulso de PGFM. También un aumento en las concentraciones de la LH en las horas -1 y 2. En el experimento dos, compararon el último pulso de preluteólisis con el primer pulso de la luteólisis. La LH incrementó rápidamente durante la pre-luteólisis y de manera gradual durante la luteólisis. Las concentraciones de la oxitocina incrementaron en las horas -2 y 0 y disminuyeron en el transcurso de las primeras dos horas, a la par de las concentraciones de PGFM. Las concentraciones de estradiol-17 $\beta$  fueron mayores durante la luteólisis que en la pre-luteólisis. Ginther *et al.* (2010d) pudieron demostrar la existencia de patrones de progesterona dentro de los pulsos de PGFM, y que, además, difieren entre cada etapa de luteólisis. Imam *et al.* (2010), del grupo de Ginther, investigaron el efecto de la administración de estradiol-17 $\beta$  durante dos horas constitutivas en el período preluteolítico (14 días post-ovulación), sobre los pulsos de PGFM en vaquillas. El estradiol-17 $\beta$  incrementa las concentraciones de PGFM en 4 horas y los pulsos fueron más prominentes. La progesterona disminuye entre las horas -2 y 0 e incrementa entre las horas 0 y 2. El estradiol-17 $\beta$  incrementa la concentración de la LH en las horas -1 a 1 de un pulso inducido. Después de la administración de estradiol-17 $\beta$ , se observó un mayor número de vaquillas con pulsos de PGFM y un incremento en el número de pulsos. La progesterona disminuyó después de 12 horas en el grupo de estradiol-17 $\beta$ , indicando un efecto luteolítico de la secreción de la PGF2 $\alpha$  inducido por estradiol-17 $\beta$  (Ginther *et al.* 2010c).

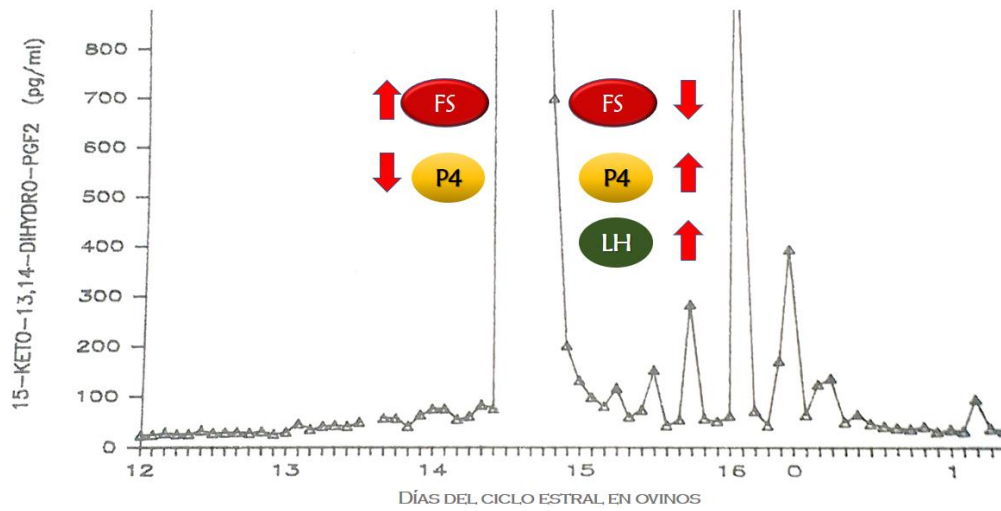


Figura 12. Características intra pulso de las concentraciones de progesterona (P4), hormona luteinizante (LH) y el flujo sanguíneo (FS). Las concentraciones de PGFM corresponden a una oveja estudiada por Zarco, datos no publicados. Cambios en FS, P4 y LH basados en: Ginther *et al.* 2011.

4.1.4.1. ¿Son diferentes los efectos de la administración de la PGF2 $\alpha$  o sus análogos, de acuerdo con su método de administración?

Los resultados de Shrestha *et al.* (2010) aportaron nuevos panoramas relacionados con la naturaleza de la luteólisis. Utilizando vaquillas durante la fase lútea media (día 9), compararon los efectos de simular un pulso natural de PGF2 $\alpha$  (infusión intra uterina de 0.25 mg/h de la PGF2 $\alpha$ ) versus la inyección intrauterina de 4 mg de PGF2 $\alpha$ . Los mismos autores reportan un incremento temprano en las concentraciones de progesterona con ambos tratamientos. Sin embargo, en el grupo de la inyección se observó un incremento en el flujo sanguíneo, así como en las concentraciones de cortisol y prolactina, eventos que no ocurrieron durante la simulación del pulso natural de PGF2 $\alpha$ . Shrestha *et al.* (2010) indican que el tratamiento con inyección fue farmacológico, por lo que no se puede concluir sobre la naturaleza de la luteólisis. Sin embargo, mucho de lo que hoy sabemos sobre la naturaleza de la luteólisis, ha sido basado en trabajos con luteólisis inducida.

Por otro lado, hay diferencias en cuando la luteólisis natural y la inducida, ya que una dosis suprafisiológica de PGF2 $\alpha$  puede producir una respuesta de progesterona no natural, como un inmediato incremento transitorio de la progesterona circulante, antes de la disminución luteolítica (Ginther *et al.* 2009). La infusión intrauterina de 0.25 mg/h de PGF2 $\alpha$  durante dos horas simula un pulso natural de PGF2 $\alpha$  (Shrestha *et al.* 2010). La dosis fisiológica de la PGF2 $\alpha$  es de 10<sup>-8</sup> M, mientras que dosis menores (10<sup>-6</sup> M) provocaron la secreción de progesterona y fueron más responsivas a la estimulación de la LH, durante la fase lútea media (Bah *et al.* 2006). Lo anterior indica que a esas dosis la hormona no provocó una respuesta del cuerpo lúteo, por lo que continuó con su actividad esteroideogénica. Pate *et al.* (2012), indica que claramente, arriba de una concentración de 1  $\mu$ M de la PGF2 $\alpha$ , sus efectos pueden ser mediados por la PGE2, lo cual puede explicar los efectos luteotrópicos de la PGF2 $\alpha$  sobre las células lúteas in vivo.

En el ovino una dosis de 15 mg de PGF2 $\alpha$  excede la capacidad catabólica de los pulmones, por lo que la unidad útero ovárica puede tener un papel significativo en regular las concentraciones periféricas de PGF2 $\alpha$ . Una dosis de 5 mg de la PGF2 $\alpha$  está dentro de la capacidad catabólica de los pulmones (Wade y Lewis, 1996). Una dosis de PGF2 $\alpha$  capaz de inducir la regresión completa de un CL maduro con una sola administración es una sobredosis. Sus efectos sobre la progesterona en ganado vacuno provocan un incremento no fisiológico en las concentraciones de progesterona durante los primeros 30 min post-tratamiento, una disminución más allá de su concentración inicial y una recuperación después de dos horas dependiente de la dosis, seguido por una disminución progresiva hasta el final de la luteólisis (Ginther y Beg, 2012b).

Es importante notar que algunas ovejas pueden ser más sensibles a los pulsos secuenciales de PG que otras (McCracken, 2012). La razón no está clara pero puede deberse a pequeñas variaciones en su naturaleza cíclica y longitud de los ciclos estrales, que podría incrementar o disminuir sus sensibilidad al número de pulsos de la PGF2 $\alpha$ .

#### *4.1.5. Variaciones en la respuesta del cuerpo lúteo a la PGF2 $\alpha$ durante la fase lútea*

El cuadro 2 ilustra los cambios reportados en las concentraciones de diferentes moléculas a lo largo de las diferentes etapas de la fase lútea. El cuerpo lúteo en desarrollo tiene diferencias con respecto al cuerpo lúteo maduro que afectan su capacidad o incapacidad para completar la luteólisis. Adicionalmente, el ambiente endócrino en el que se encuentra el cuerpo lúteo al momento del tratamiento con PGF2 $\alpha$ , podría cambiar su destino. Por otra parte, el cuerpo lúteo muestra diferente producción de factores luteoprotectores o pro-luteolíticos, enzimas y hormonas en distintas etapas de la fase lútea. Durante la fase lútea temprana, los niveles de progesterona incrementan y los niveles máximos se encuentran durante la fase lútea media.

A medida que se va desarrollando el cuerpo lúteo, las células lúteas grandes expresan receptores para PGF2 $\alpha$  (Juengel *et al.* 1996), y estrógenos (Wiltbank, 1994). También expresan y PGDH en el citosol (Silva *et al.* 2000). Las células lúteas pequeñas muestran receptores para LH (Wiltbank, 1994) y oxitocina (Davis *et al.* 2010). La COX-1, PGF sintasa y PG 15-deshidrogenasa se expresan en niveles constantes (constitutivos), mientras que la COX-2, la PGE sintasa y el PGT, los EP2, EP3 y el FP son altamente modulados durante las diferentes fases del ciclo de vida del cuerpo lúteo (Arosh *et al.* 2002; 2004).

##### *4.1.5.1. Efectos de la administración de la PGF2 $\alpha$ : Fase lútea temprana.*

La figura 13 muestra algunos de los efectos de la PGF2 $\alpha$  cuando se administra durante diferentes etapas de la fase lútea. Durante la fase lútea temprana, es improbable que se completen los eventos luteolíticos de manera espontánea, debido a varios factores pro y antiluteolíticos presentes en el cuerpo lúteo. El cuerpo lúteo de la fase lútea temprana (día 5) produce activamente tanto PGE2 como PGF2 $\alpha$ , comparado con la fase lútea tardía (Kumagai *et al.* 2014). La PGF2 $\alpha$  endógena o exógena, tiene diferentes efectos si se administra durante la fase lútea temprana. El incremento en el Ca<sup>2+</sup> intracelular inducido por la PGF2 $\alpha$  en células esteroidogénicas del cuerpo lúteo maduro es mayor que en las células del cuerpo lúteo en desarrollo (Wright *et al.* 2014). El 20% de las células lúteas del CL

Cuadro 2. Cambios reportados de las diferentes moléculas a lo largo de las diferentes etapas de la fase lútea.

Características del CL	Fase lútea temprana	Fase lútea media	Fase lútea tardía	Referencias
Progesterona plasma	↑g	>	↓	Niswender <i>et al.</i> 2000
StAR	↑	↓g	↓g	Niswender <i>et al.</i> 2000
P450scc	↑g	>	↓	
3β-HSD	↑g	E	↓	
PGE2	↑g	↑	↓	Niswender <i>et al.</i> 2000; Banu <i>et al.</i> 2003; Kumagai <i>et al.</i> 2014
PGDH	↑			Silva <i>et al.</i> 2000
E2	ERα ↑		↑	Schams y Berisha, 2002
VEGF	>	↑	↓	Berisha y Schams 2005; Miyamoto <i>et al.</i> 2009; Christensen <i>et al.</i> 2012
FGF	>	↑g	E	Berisha y Schams 2005,
ON	↑	↓	↑	Miyamoto <i>et al.</i> 2005; 2009
ET-1	↑g	↓	↑*	Miyamoto <i>et al.</i> 2009; Meidan y Levy 2002
PGF2α	↑g	↑	>	Niswender <i>et al.</i> 2000
FP	↑g E	↑g*	↑ ↑	Tsai y Wiltbank 1998; Shirasuna <i>et al.</i> 2012a; Arosh <i>et al.</i> 2004;
PGT	↓	↑	↑	Banu <i>et al.</i> 2003; Skarsnyshki <i>et al.</i> 2003; Arosh, 2004
OT	↓	↑	↑ >	Flint y Sheldrick, 1983 Fairclough y Lau, 1992,
COX-2	↑*	↑g	↑	Levy <i>et al.</i> 2000; Arosh <i>et al.</i> 2002; 2004; Miyamoto <i>et al.</i> 2005; 2009
Fas/Fas L	add			Slot <i>et al.</i> 2006

↑: Incremento, ↑g: incremento gradual, ↓: disminución, E: estable, >: máxima expresión o concentración, \*: indica controversia por diferentes autores, add: alto durante el diestro. Referirse al texto. Siglas: 3β-HSD: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, StAR: proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis, P450scc: citocromo P450 que corta la cadena lateral, PGE2: prostaglandina E2, FS: flujo sanguíneo, MAPK: proteína cinasa mitógeno activada, ACE, enzima convertidora de angiotensina, i.l: intraluteal, LH: hormona luteinizante, ET-1: endotelina -1, FP: receptor para prostaglandina, PGDH; 15-hydroxyprostaglandina deshidrogenasa, EP-2: receptor para PGE2, ERα: Receptor para estradiol alfa, FS: flujo sanguíneo, ANGPT-2: Angiopoyetina-2, PGFM: 13, 14-dihidro-15-ceto PGF2α, ATF3: factor de transcripción activante 3, ON: óxido nítrico, NOS: Oxido nítrico sintasa, eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial, Cp: CaspasaPGT: Proteína transportadora de prostaglandinas, COX-2: ciclooxigenasa-2, OT: oxitocina, OTR: receptor para oxitocina, FP: receptor para prostaglandina, PGDH; 15-hydroxyprostaglandina deshidrogenasa.

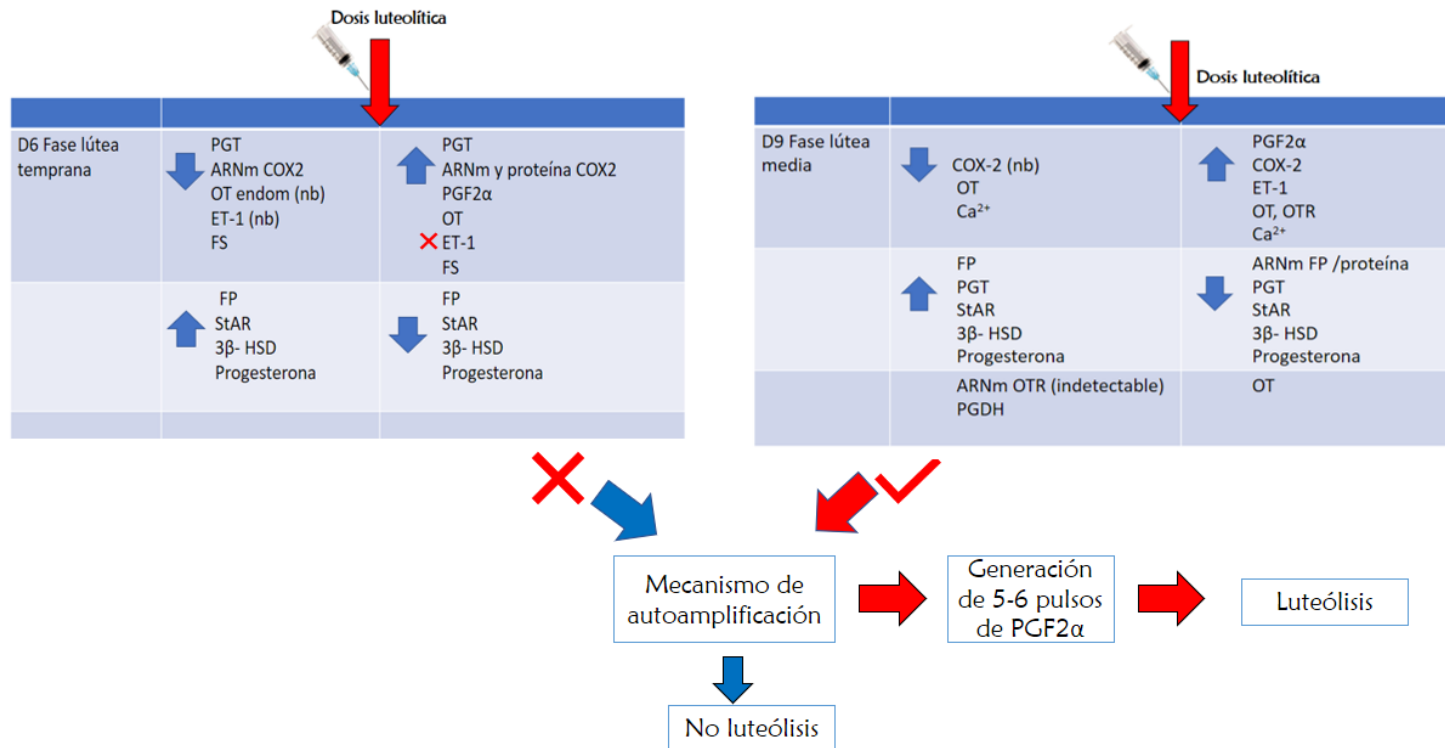


Figura 13. Los efectos sugeridos de las acciones de la PGF2α cuando se administra en diferentes etapas de la fase lútea. Referirse al texto. Siglas: PGT: Proteína transportadora de prostaglandinas, COX-2: ciclooxigenasa-2, OT: oxitocina, OTR: receptor para oxitocina, ET-1: endotelina -1, FP: receptor para prostaglandina, PGDH; 15-hydroxyprostaglandina deshidrogenasa, EP-2: receptor para PGE2, ERα: Receptor para estradiol alfa, FS: flujo sanguíneo, ON: óxido nítrico, 3β-HSD: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, StAR: proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis. Basado en: Milvae y Hansel, 1983; Tsai y Wiltbank 1998; Kobayashi *et al.* 2001b; Meidan y Levy 2002; Wiltbank y Ottobre. 2003; Wright *et al.* 2014.



temprano o medio mostraron un incremento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  después de los tratamientos con 100nm de  $\text{PGF2}\alpha$  (Wiltbank *et al.* 1995). Este incremento en  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser causado por la oxitocina y por el sistema de autoamplificación de la  $\text{PGF2}\alpha$ . Sin embargo, para que pueda llevarse a cabo la luteólisis, es necesario la presencia de receptores para FP, los cuales se observan al mismo tiempo y en las mismas células lúteas que están sintetizando progesterona. La adquisición del FP de alta afinidad comienza en el día 2 después de la ovulación (Tsai y Wiltbank. 1998) y, durante la fase lútea temprana se incrementa la producción de la  $\text{PGF2}\alpha$  más que durante la fase lútea media en el bovino (Milvae y Hansel, 1983).

Durante la fase lútea temprana la secreción de las prostaglandinas y las concentraciones de ARNm para COX-2 están más elevadas que durante la fase lútea media o tardía (Wiltbank y Ottobre. 2003). Sin embargo, el cuerpo lúteo en desarrollo también produce la PGDH, (Wiltbank y Ottobre. 2003) enzima que se opone a la acción de la COX-2, además de que es responsable de convertir a la  $\text{PGF2}\alpha$  en su metabolito inactivo, por lo que si se encuentra en altas cantidades podría permitir la disminución en las concentraciones de la  $\text{PGF2}\alpha$  en el CL temprano, llevando a la resistencia. Debido a las altas concentraciones de la PGDH en el citosol de las células lúteas grandes, el cuerpo lúteo temprano tiene una gran capacidad para catabolizar la  $\text{PGF2}\alpha$  (Silva *et al.* 2000). Por otra parte, durante la fase lútea temprana, las concentraciones de ARNm para inhibidores de la PKC están elevadas. Este incremento también puede estar relacionado con la resistencia del cuerpo lúteo a la  $\text{PGF2}\alpha$  (Juengel *et al.* 1998). La biosíntesis de la PGE2 en el útero (Silvia *et al.* 1984) y la expresión del ARNm para la EP2 (Arosh *et al.* 2004) incrementa durante la fase lútea temprana. A pesar de que los niveles de PGT son bajos, esta proteína transporta ambas prostaglandinas ( $\text{PGF2}\alpha$  o PGE2) con igual afinidad y de manera competitiva (Arosh *et al.* 2004), por lo que si hay más cantidad de PGE2 pasará más de ésta. Además, las hormonas esteroideas también se modulan de acuerdo con la fase lútea. El número de receptores de estradiol en el estroma y epitelio glandular superficial del miometrio disminuye durante la fase lútea temprana. El receptor de progesterona en el epitelio luminal y en las glándulas superficiales se desarrolla en la fase lútea temprana (días 1-2) y alcanza su máximo durante la fase lútea temprana (Wathes y Hamon 1993).

La figura 10 muestra los efectos de la  $\text{PGF2}\alpha$  en las diferentes etapas de la fase lútea. Debido a que las acciones de la  $\text{PGF2}\alpha$  son antiluteolíticas en ovejas (Pratt *et al.* 1977), e incluyen la disminución de la actividad  $3\beta$ -HSD tanto en el día 4 como en el día 11 del ciclo (Tsai y Wiltbank 1998). Cuando se administre una dosis de la  $\text{PGF2}\alpha$  exógena, el cuerpo lúteo de la fase lútea temprana es funcionalmente activo, en teoría (Tsang *et al.* 1995).

Existen diferencias entre especies con respecto a la sensibilidad del cuerpo lúteo en diferentes etapas de la fase lútea. Por un lado, en el bovino se ha establecido que una sola inyección de PGF2 $\alpha$  durante la etapa temprana del cuerpo lúteo (antes del día 5) no completa la luteólisis (Tsai y Wiltbank 1998), por lo que es posible inducir la luteólisis completa con PGF2 $\alpha$  exógena sólo en entre los días 6-12 del ciclo, pero no en un cuerpo lúteo de entre 2 y 4 días de edad (Girsh *et al.* 1995). Además, cuando la PGF2 $\alpha$  se administra durante la fase lútea temprana, no puede incrementar la expresión del gen de la ET-1 ni el de sus receptores en el cuerpo lúteo, mientras que en ambos genes se inducen en la fase lútea media por la PGF2 $\alpha$  (Meidan y Levy 2002).

En contraste, Rubianes *et al.* (2003) y Pope y Cárdenas (2004) concluyeron que en el ovino el cuerpo lúteo de la fase lútea temprana puede responder desde el tercer día del ciclo. Entonces, durante la fase lútea temprana el tratamiento con PGF2 $\alpha$  podría ser efectivo porque produce un incremento en el ARNm para la COX2 (Levy *et al.* 2000). En forma natural los niveles de la COX-2 son bajos durante las etapas lúteas temprana y media, pero después del tratamiento con PGF2 $\alpha$  durante la etapa media, los niveles de la COX-2 se elevan significativamente 4 h post-tratamiento y va disminuyendo durante las siguientes 7 y 24 hrs (Levy *et al.* 2000). Es probable que esto se deba a una retroalimentación positiva de la la PGF2 $\alpha$  con el ARNm para la COX2 durante la fase lútea media (un incremento de 3 veces), pero esta retroalimentación no se induce por la ausencia del mecanismo de autoamplificación de la PGF2 $\alpha$  en el cuerpo lúteo temprano (Tsai y Wiltbank, 1998). A la par, en el día 4 es improbable que se produzca la luteólisis, debido a que el cuerpo lúteo tiene una gran capacidad para catabolizar a la PGF2 $\alpha$  (Silva *et al.* 2000). Durante la etapa temprana del cuerpo lúteo, se observa mayor actividad de la PGDH, semejante a la que hay durante el período de reconocimiento de preñez (Díaz *et al.* 2002). La acción de la PGDH se opone a la actividad biosintética de la COX-2 lo cual previene, según Silva *et al.* (2000), la acumulación lútea de la PGF2 $\alpha$ , sumándose las bajas concentraciones de la COX-2 en la fase lútea temprana y al incremento paulatino en la expresión de ARNm para EP2 (Arosh *et al.* 2004).

#### 4.1.5.2. Efectos de la administración de la PGF2 $\alpha$ : Fase lútea media

El ARNm para el FP incrementa en la fase lútea temprana y media (Shirasuna *et al.* 2012a) (Cuadro 2). Sin embargo, Levy *et al.* (2000) menciona que disminuye durante la etapa lútea. Igualmente, el incremento de la COX-2 fue reportado por Tsai y Wiltbank (1998), mientras que Levy *et al.* (2000) indican que disminuye. La máxima expresión del ARNm de la COX-2 y su proteína se observa entre los días 13 y 21 del ciclo, y coincide con el tiempo esperado de luteólisis (Arosh *et al.* 2002). Sin

embargo, después de la administración exógena de la  $\text{PGF2}\alpha$  durante la fase lútea media el ARNm para la COX-2 se incrementa de manera transitoria (Levy *et al.* 2000) (Cuadro 2).

Ya que en esta etapa la síntesis de prostaglandinas está encaminada a producir más  $\text{PGF2}\alpha$ , tiene mayor posibilidad de llegar al ovario si hay más PGT disponibles. La expresión de la PGT y su proteína se incrementa durante la fase lútea media (Arosh *et al.* 2004) o tardía del ciclo (Banu *et al.* 2003). Durante el período de luteólisis, la expresión de la PGT ovina fue más abundante en las células epiteliales luminales del endometrio (Banu *et al.* 2008). Una vez que llega al ovario, el FP debería estar disponible. Sin embargo, durante la fase lútea media, los reportes de los niveles de ARNm para el FP son controversiales. Levy *et al.* (2000) muestra que el ARNm para el FP permanecen bajos, mientras Shirasuna *et al.* (2012a), Kumagai *et al.* (2014) y Graves *et al.* (1995) mencionan que el ARNm para FP incrementa durante la fase lútea media. Lo más importante, es que la  $\text{PGF2}\alpha$  ejerce sus efectos a través de su unión con su receptor.

Por otro lado, durante la fase lútea media, las concentraciones de la progesterona se encuentran en su máximo nivel. Después de que se administra la hormona luteolítica, la concentración de la progesterona disminuye en tan sólo 4 horas (Berisha *et al.* 2010). El efecto de la administración de la  $\text{PGF2}\alpha$  sobre la progesterona se puede observar sobre las enzimas esteroidogénicas. Levy *et al.* (2000) administraron cloprostenol durante la fase lútea temprana y media. Sus efectos sobre las enzimas StAR y P450scc no tuvieron cambios significativos cuando se administraron durante la etapa temprana, pero sí cuando se inyectaron durante la etapa media. La  $\text{PGF2}\alpha$  no altera la secreción estimulada por la LH en el cuerpo lúteo joven, mientras que en el cuerpo lúteo maduro la  $\text{PGF2}\alpha$  reduce significativamente el efecto estimulador de la LH sobre la secreción de progesterona (Girsh *et al.* 1995).

Por otra parte, la sobrevivencia del cuerpo lúteo depende mucho de la funcionalidad de las redes vasculares. Una de las acciones de la  $\text{PGF2}\alpha$  es modificar el flujo sanguíneo que se dirige al cuerpo lúteo. Se ha demostrado que el tratamiento con  $\text{PGF2}\alpha$  por vía intrauterina o sistémica provoca un incremento transitorio en el flujo sanguíneo del cuerpo lúteo, lo que también ocurre durante los pulsos del PGFM en la luteólisis espontánea (Ginther *et al.* (2007). Aun cuando el cuerpo lúteo comienza a regresar, la microvasculatura permanece (Conley *et al.* 1995). Durante la fase lútea temprana, la  $\text{PGF2}\alpha$  disminuyó después de dos horas la expresión del ARNm para el VEGF y el VEGFR1, pero se recuperó a las 4 horas del tratamiento. Sin embargo, durante la fase lútea media, no sufrieron cambios en estas primeras dos horas, pero a las 24 horas la  $\text{PGF2}\alpha$  inhibió dramáticamente (5–10 veces) las concentraciones de los VEGF, los VEGFR-1, y los VEGFR-2. También se ha reportado un efecto más rápido, ya que tan sólo luego de media hora después de la inyección con  $\text{PGF2}\alpha$  se observa

una disminución en las concentraciones del VEGF A (Berisha *et al.* 2010). Asimismo, los genes de la ET-1 luteal o sus receptores se inducen naturalmente durante la fase lútea media por la PGF2 $\alpha$  (Meidan y Levy 2002). Por lo que, después de la inyección de la PGF2 $\alpha$  en el día 10 del ciclo, las concentraciones en plasma de la ET-1 se incrementaron significativamente en 24 h, mientras que cuando se utilizó cloprostenol en el día 4 no se observó algún incremento de los receptores o el ARNm para la ET-1 (Levy *et al.* 2000), como se había mencionado antes.

Tomando como base lo anterior, es posible que los efectos de la PGF2 $\alpha$  sobre el cuerpo lúteo sean variables de acuerdo con la etapa de la fase lútea en la cual esta se administre. Las razones por las cuales se pudo sugerir que el cuerpo lúteo responde de manera menos variable a la administración de la PGF2 $\alpha$  durante la fase lútea media, se basa en varias premisas.

En la luteólisis espontánea, aún con poca concentración de PGF2 $\alpha$  endometrial, es capaz de estimular su propia síntesis, proceso conocido como mecanismo de amplificación de la PGF2 $\alpha$  (Tsai y Wiltbank, 1997). Por lo que el cuerpo lúteo de la etapa media tiene la capacidad de responder a la PGF2 $\alpha$  con la generación de PGF2 $\alpha$  intraluteal e inhibición de la producción de progesterona luteal, capacidades que se han sugerido se encuentran disminuidas en el cuerpo lúteo temprano (Tsai y Wiltbank, 1998). Cabe recalcar, que este mecanismo de autoamplificación sólo ocurre en cuerpo lúteo con capacidad luteolítica y no en un cuerpo lúteo sin esta capacidad (Wiltbank y Ottobre, 2003).

## **CAPITULO 2**

### **RESPUESTA ESTRAL A DIFERENTES DOSIS DE CLOPROSTENOL EN DISTINTAS ETAPAS DE LA FASE LÚTEA EN OVEJAS SUFFOLK: ESTUDIO PILOTO**

**Resumen:** El objetivo del presente trabajo fue determinar la presentación de signos de estro en respuesta a 3 diferentes dosis de cloprostenol, administradas durante la fase lútea temprana, media o tardía de ovejas Suffolk. El objetivo fue definir las dosis a utilizar en un estudio posterior en el que se evaluaría la eficiencia luteolítica de dosis reducidas de cloprostenol. A partir del día 30 postparto, 42 ovejas se trataron con una dosis alta (252  $\mu\text{g/mL}$ ), media (126  $\mu\text{g/mL}$ ) o baja (42  $\mu\text{g/mL}$ ) de cloprostenol en la fase lútea temprana (día 5-7); media (día 8-10) o tardía (día 11-13) y se detectaron calores dos veces al día durante las primeras 72 horas posteriores al tratamiento. No hubo diferencia entre dosis ni entre etapas de la fase lútea con respecto a la respuesta estral de las ovejas (Porcentaje de ovejas que presentaron comportamiento de estro después del tratamiento,  $P > 0.05$ ). Se concluye que el cloprostenol fue efectivo para inducir la respuesta estral con cualquiera de las dosis propuestas, independientemente de la etapa de la fase lútea en la cual se administró. Por esta razón en experimentos encaminados a evaluar las causas de variabilidad en la respuesta luteolítica al cloprostenol se deberán evaluar dosis menores a las empleadas en el presente trabajo.

#### **Introducción**

La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  natural y varios de sus análogos sintéticos se han utilizado para la sincronización de estros en animales de abasto desde hace algunas décadas. El cloprostenol es el análogo de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  más utilizado en ovinos. Se han empleado dosis que varían desde los 38.5  $\mu\text{g}$  hasta los 126  $\mu\text{g/animal}$ , aplicadas ya sea como dosis única o en dos administraciones con un intervalo de 7 a 9 días de diferencia (Contreras-Solís 2009 a y b, Fierro *et al.* 2011). Aunque una dosis luteolítica efectiva de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  natural (15 mg, Herrera *et al.* 1990) o sintética (125  $\mu\text{g}$ , Contreras-Solís *et al.* 2009) causa la regresión del CL en la mayoría de las hembras, se ha encontrado que una proporción variable de los animales tratados no sufre la regresión completa del cuerpo lúteo (Herrera *et al.* 1990). Parte de la variabilidad en la respuesta tiene que ver con diferencias en la sensibilidad del cuerpo lúteo en diferentes días de la fase lútea (Pope y Cárdenas, 2004; Rubianes *et al.*, 2003). Sin embargo, aun cuando la hormona se aplica en el mismo día del ciclo estral se producen diferencias en la respuesta

de distintos animales, por lo que es conveniente estudiar cuales podrían ser los factores que afectan la respuesta individual. Para poder evaluar estos factores es conveniente encontrar una dosis de PGF2 $\alpha$  natural, o de alguno de sus análogos, que resulte en luteolisis completa en aproximadamente 50 % de los animales tratados y en falla luteolítica en la otra mitad de los animales. Esto permitiría estudiar con la máxima sensibilidad las diferencias entre los animales que responden con lisis del cuerpo lúteo de aquellos que no lo hacen. Por esta razón, en este estudio piloto se realizó una primera aproximación evaluando la presentación de signos de estro después de aplicar distintas dosis de cloprostenol en distintos días de la fase lútea.

### **Materiales y métodos**

El trabajo se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina de la Universidad Nacional Autónoma de México durante los meses de octubre a enero, que corresponden a la época reproductiva. Se utilizaron 42 ovejas Suffolk adultas (3-8 años de edad) que se encontraban ciclando. La distribución de las ovejas se realizó de acuerdo con el cuadro 1. Cada oveja se asignó aleatoriamente a uno de 9 grupos de acuerdo a la dosis de cloprostenol sódico, administrada por vía intramuscular y a la etapa de la fase lútea (días después del estro) en que se administró el clorpostenol. Cada tratamiento se repitió tres veces en la misma oveja, con la misma dosis y en la misma etapa de la fase lútea, excepto por tres animales que no pudieron ser incluidos en la tercera repetición debido a problemas de salud. El estro se detectó utilizando machos con mandil (2 veces por día) durante las primeras 72 horas después de cada tratamiento. Se realizó una prueba de Ji-cuadrada en una tabla de contingencia 3x3 (3 dosis de la PGF2 $\alpha$  administradas en 3 etapas de la fase lútea).

### **Resultados**

En el cuadro 2 se observa que entre el 80 % y el 100 % de las ovejas tratadas con diferentes dosis y en distintas etapas de la fase lútea presentaron estro dentro de las 72 horas siguientes al tratamiento. Las diferencias entre grupos no fueron significativas ( $p < 0.05$ ). La mayoría de las ovejas presentaron estro a las 48 horas después de recibir los tratamientos, siendo las únicas excepciones los tratamientos con dosis baja o media durante la fase lútea temprana, en las que algunas ovejas presentaron estro antes de las 48 horas, resultando en intervalos promedio al estro menores que en los otros grupos (Cuadro 2).

**Cuadro 1.** Distribución de las ovejas dentro de cada grupo (dosis de cloprostenol) y etapa de la fase lútea.

Etapa de la fase lútea	Dosis ( $\mu\text{g}/\text{oveja}$ )	Número de animales en cada repetición		
		Primera	Segunda	Tercera
<b>Temprana (día 5-7)</b>	252	5	5	5
	126	4	4	4
	42	5	5	5
<b>Media (día 8-10)</b>	252	5	5	5
	126	5	5	3
	42	4	4	4
<b>Tardía (día 11-13)</b>	252	4	4	4
	126	5	5	4
	42	5	5	5

**Cuadro 2.** Porcentaje de ovejas Suffolk que presentaron comportamiento de estro después del tratamiento con diferentes dosis de estradiol administradas en la fase lútea temprana, media o tardía.

Dosis of cloprostenol	Temprana (día 5-7)	Media (día 8-10)	Tardía (día 11-13)
252 $\mu\text{g}/\text{mL}$			
% en estro	80 (12/15)	100 (15/15)	100 (12/12)
Intervalo al estro (h)	48 $\pm$ 0	48 $\pm$ 0	48 $\pm$ 0
126 $\mu\text{g}/\text{mL}$			
% en estro	91.7 (11/12)	84.6 (11/13)	85.7 (12/14)
Intervalo al estro (h)	36 $\pm$ 14	48 $\pm$ 0	48 $\pm$ 0
42 $\mu\text{g}/\text{mL}$			
% en estro	100 (15/15)	91.7 (11/12)	93.3 (14/15)
Intervalo al estro (h)	43 $\pm$ 11	48 $\pm$ 0	48 $\pm$ 0

Las diferencias entre grupos no son significativas

### Discusión

No existieron diferencias en la respuesta estral entre dosis ni entre las etapas de la fase lútea ya que la respuesta estral encontrada con todas las dosis de cloprostenol utilizadas en el presente trabajo estuvo por arriba del 80%. Esto indica que aún la dosis más baja evaluada (42  $\mu\text{g}$  por animal) es

luteolítica, por lo que no fue posible encontrar una dosis que produzca una elevada incidencia de fallas luteolíticas. Por lo anterior, en futuros trabajos se deberán utilizar dosis más reducidas. Contreras-Solís *et al.* (2009b) demostraron que se puede inducir el comportamiento estral en ovejas utilizando dosis reducidas de cloprostenol (126, 68.25 y 38.5µg), lo que, para nuestros objetivos, refuerza la necesidad de utilizar dosis aún menores para poder evaluar las diferencias individuales en la respuesta a dichas dosis. No obstante, también se ha reportado que, al experimentar con dosis decrecientes de PGF2α natural (8, 16 o 24 mg), la mayor proporción de ovejas mostrando comportamiento estral se observan con la administración de las dosis más altas (Fukui y Roberts, 1981). Olivera-Muzante *et al.* (2011) mostró que la dosis de 160 µg es más efectiva en términos de índice de concepción y fecundidad que la de 80 µg. En su revisión, Fierro *et al.* (2013) propone una asociación entre las dosis administradas y el porcentaje de ovejas que responden al tratamiento mostrando comportamiento estral.

Es posible que la eficiencia de una dosis determinada de la PGF2α o de sus análogos pueda variar de acuerdo con la etapa de la fase lútea en la cual se administre (Acritopolou y Haresign, 1980, Hackett y Robertson, 1980). Sin embargo, en el presente trabajo, debido a que aún la más pequeña dosis de cloprostenol utilizada (42 µg/mL) tuvo una alta efectividad, no fue posible determinar si existieron diferencias en la sensibilidad al cloprostenol en las diferentes etapas de la fase lútea. Debido a esto, en trabajos posteriores deberá seguirse incluyendo la etapa de la fase lútea como un factor a evaluar, pero utilizando dosis menores de cloprostenol que las que fueron usadas en el presente estudio.

### **Conclusión**

Se concluye que el cloprostenol fue efectivo en inducir la respuesta de estro en cualquiera de las dosis propuestas, independientemente de la etapa de la fase lútea en la cual se haya administrado, por lo que en trabajos posteriores de esta tesis se deben utilizar dosis aún menores de cloprostenol.

### **Referencias**

1. Acritopolou, S., Haresign, W., 1980. Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF-2α given at different stages of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 58, 219-223.
2. Contreras-Solís I., Vasquez B., Diaz T., Letelier C., Lopez-Sebastian A., González-Bulnes A. 2009a. Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and “male effect”. *Theriogenology* 71, 1018–1025.



3. Contreras-Solís I., Vasquez B., Diaz T., Letelier C., Lopez-Sebastian A., González-Bulnes A. 2009b. Ovarian and endocrine responses in tropical sheep treated with reduced doses of cloprostenol. *Anim. Reprod. Sci.* 114,384-392.
4. Fierro S., Olivera-Muzante J., Gil J., Viñoles C. 2011. Effects of prostaglandin administration on ovarian follicular dynamics, conception, prolificacy, and fecundity in sheep. *Theriogenology* 76,630-639.
5. Fukui Y., Roberts E.M. 1981. Relationship between doses of prostaglandin F2 $\alpha$  and stages of the breeding season for synchronization of estrus and ovulation in ewes. *Theriogenology*, 16,105-117.
6. Fierro S., Gil J., Viñoles C., Olivera-Muzante J. 2013. The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. *Theriogenology* 79,399-408.
7. Hackett, A.J., Robertson, H.A., 1980. Effect of dose and time of injection of prostaglandin F2 $\alpha$  in cycling ewes. *Theriogenology* 13,347–351.
8. Herrera H.L., Feldman S.D., Zarco Q.L., Valencia M.J., Ortíz H.A., Ángeles C.S. 1990. Evaluación del efecto luteolítico de la prostaglandina F2 alfa en diferentes días del ciclo estral de la borrega. *Vet. Mex.* 21,143-147.
9. Olivera-Muzante J., Gil J., Fierro S., Menchaca A., Rubianes E. 2011. Alternatives to improve a prostaglandin-based protocol for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 76,1501–1507.
10. Pope W.F., Cárdenas H., 2004. Sensitivity of sheep to exogenous prostaglandin F2 $\alpha$  early in the estrous cycle. *Small Rumin. Res.* 55,245–248.
11. Rubianes E., Menchaca A., Carbajal B. 2003. Response of the 1–5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2 $\alpha$ . *Anim. Reprod. Sci.* 78, 47–55.

*“Libre, y para mi sagrado, es el derecho de pensar... La educación es fundamental para la felicidad social; es el principio en el que descansan la libertad y el engrandecimiento de los pueblos”*

*Benito Juárez*

### **CAPITULO 3.**

#### **LA EFICIENCIA LUTEOLÍTICA DE DOSIS REDUCIDAS DE CLOPROSTENOL EN LA OVEJA. EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA AL MOMENTO DEL TRATAMIENTO.**

##### **Artículo publicado:**

Animal Reproduction Science 186 (2017) 68-76

Luteolytic efficiency of reduced doses of cloprostenol in the ewe. Effect of progesterone concentrations at the time of treatment.

Luz María Granados-Villarreal<sup>a</sup>, Luis Zarco <sup>a</sup>, Octavio Mejía<sup>a</sup>, María Teresa Sánchez-Torres<sup>b</sup>, José Luis Pablos-Hach<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510, Mexico

<sup>b</sup>Colegio de Postgraduados (COLPOS), Programa de Ganadería, Campus Montecillo, Estado de México, Mexico



Contents lists available at ScienceDirect

## Animal Reproduction Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/anireprosci](http://www.elsevier.com/locate/anireprosci)



### Luteolytic efficiency of reduced doses of cloprostenol in the ewe. Effect of progesterone concentrations at the time of treatment



Luz María Granados-Villarreal<sup>a</sup>, Luis Zarco<sup>a,\*</sup>, Octavio Mejía<sup>a</sup>,  
María Teresa Sánchez-Torres<sup>b</sup>, José Luis Pablos-Hach<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510, Mexico

<sup>b</sup> Colegio de Postgraduados (COLPOS), Programa de Ganadería, Campus Montecillo, Estado de México, Mexico

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
PGF2 $\alpha$   
Cloprostenol  
Luteolytic efficiency  
Luteoprotective effect  
Progesterone

#### ABSTRACT

Seventy six ewes were treated with 7.5, 12.5, 25 or 50  $\mu$ g of cloprostenol on day 6 or 9 post-estrus to compare the luteolytic efficiency of the PGF2 $\alpha$  analogue at each stage and to evaluate if progesterone concentrations at the time of treatment affect such efficiency. Blood samples were obtained before cloprostenol administration and 12, 24, 48, and 72 h thereafter. There was an effect of dose ( $p < 0.05$ ) but not of day post-estrus on the proportion of animals completing luteolysis. As the dose increased, the proportion of ewes completing luteolysis also increased. Also, as the dose increased from 7.5 to 25  $\mu$ g, more ewes showed a transient progesterone decline instead of an absence of response, indicating that in some ewes reduced doses initiated luteolysis but were not able to finish the process. Since the dose of 25  $\mu$ g resulted in close to 50% luteolytic efficacy, this group was used to study the effects of progesterone concentrations at the time of treatment on the response to cloprostenol. Pre-treatment progesterone concentrations were higher ( $p < 0.01$ ) in ewes experiencing luteolytic failure than in those that completed luteolysis. There was a negative correlation between initial progesterone concentrations and their reduction by 12 h post-treatment. It is concluded that high progesterone concentrations are associated with a reduction in sensitivity to small doses of cloprostenol. Possible mechanisms and implications of this luteoprotective effect are discussed.

#### 1. Introduction

Prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) has been extensively used for estrus synchronization in the ewe (for reviews see Abecia et al., 2011; Fierro et al., 2013). Intramuscular administration of an appropriate dose of either natural PGF2 $\alpha$  (Hackett and Robertson, 1980) or some of its synthetic analogues (Acritopeoulou et al., 1977; Baird and Scaramuzzi, 1975) is an effective and practical method to induce luteolysis.

Considerable variation in luteolytic efficiency and estrous response has been observed both with natural PGF2 $\alpha$  and with its synthetic analogues (Abecia et al., 2011; Fierro et al., 2013). It is known that the luteolytic efficiency is lower when the treatment is administered before day 3 post-ovulation (Hackett and Robertson, 1980; Silva et al., 2000), but there also appear to be periods of relative insensitivity at later stages: Herrera et al. (1990) reported that luteolysis failed to occur in 33% of ewes treated with PGF2 $\alpha$  between days 7 and 10 post-ovulation, and Hernández-Cerón et al. (2001) reported an even higher failure rate on day 5 or 6 post-

\* Corresponding author.

E-mail address: [lazq@unam.mx](mailto:lazq@unam.mx) (L. Zarco).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.09.006>

Received 1 June 2017; Received in revised form 9 September 2017; Accepted 15 September 2017

Available online 18 September 2017

0378-4320/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.



ovulation. A finding shared by those two studies was that the ewes that failed to complete luteolysis had higher progesterone concentrations before the treatment than those that responded with complete luteolysis, thus suggesting a luteoprotective effect of progesterone. A direct luteoprotective role of this hormone has been postulated in the rat (Goyeneche et al., 2003), the cow (Okuda et al., 2004), the ewe (Davis et al., 2010) and the sow (Diaz et al., 2011). Alternatively, non-genomic effects of progesterone on the oxytocin-signalling elements of the endometrial cells could interfere with the endogenous endometrial release of PGF2 $\alpha$  that often occurs after exogenous administration of the hormone (Bishop and Stormshak, 2006; Bogacki et al., 2002; Grazzini et al., 1998) and that may help to complete luteolysis when reduced doses of exogenous PGF2 $\alpha$  are used (Wade and Lewis, 1996). However, to our knowledge there are no studies designed to compare the effects of pre-treatment progesterone concentrations on the luteolytic efficiency of reduced doses of PGF2 $\alpha$  in the ewe.

Cloprostenol, is currently the most widely used PGF $\alpha$  analogue for estrus synchronization in the ewe (Abecia et al., 2011; Amiridis and Cseh, 2012; Fierro et al., 2013). The use of different reduced doses of cloprostenol can be useful to identify differences in luteal sensitivity due either to the stage of the luteal phase or to the initial progesterone concentrations. It has been known for some time that both in ewes and in cows the administration of a reduced, sub-luteolytic dose of either PGF2 $\alpha$  or cloprostenol can result in one of three general types of response (Juengel et al., 2000; Colazo et al., 2002; Trevisol et al., 2015). 1- In some animals there is not a significant alteration in progesterone concentrations after administration of the sub-luteolytic dose, indicating very low sensitivity. 2- Animals with intermediate sensitivity may show a significant but transient decline in progesterone concentrations, which return to pre-treatment levels within 24–48 h after treatment. 3- Animals with higher than average sensitivity experience rapid, complete and irreversible luteolysis after administration of a reduced dose that would not be luteolytic for most ewes.

The proportion of animals with each type of response to reduced doses of cloprostenol can be useful to identify differences in CL sensitivity between stages of the luteal phase, and may also help to explain differences in the luteolytic efficacy of a full dose. Also, a dose resulting in close to 50% effective luteolysis and 50% luteolytic failure could allow for the identification of differences between the animals that respond or not with complete luteolysis to such a dose. Therefore, the objectives of this study were to compare the luteolytic response to different reduced doses of cloprostenol administered on day 6 or day 9 post-estrus, and to evaluate the effect of initial progesterone concentration on the luteolytic efficacy of the treatment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Ethics and preparation of the animals

The experiment was conducted at an experimental farm in the Central Plateau of Mexico. The protocol was approved by the Institutional Committee for the Care and Use of Experimental Animals of the Faculty of Veterinary Medicine of the National Autonomous University of Mexico, according to Mexican Official Norm NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA, 2001). Eighty adult, mixed-breed ewes were initially used. The ewes were feed on pasture and supplemented with concentrate according to requirements. Before the onset of the experiment they were synchronized with an intravaginal sponge impregnated with 20 mg of fluorogestone acetate (Chronogest, MSD Animal Health, Mexico) that remained in place for 7–9 days. At the time of sponge removal the ewes were treated with 250 IU of eCG (Folligon, MSD Animal Health, Mexico) and 125  $\mu$ g of cloprostenol (Celosil, MSD Animal Health, Mexico).

### 2.2. Experimental design

After withdrawal of the sponges, estrus was detected using intact rams fitted with an apron to prevent mating. Each ewe was assigned at the time of sponge removal to one of eight cloprostenol-treatment groups. In four groups the ewes that showed estrus were treated on day 6 post-estrus with either 7.5, 12.5, 25 or 50  $\mu$ g of cloprostenol/ewe, and in the other four groups the same treatments were administered on day 9 post-estrus. Initial assignment to the groups was random with the exception that fewer animals were assigned to the groups treated with 7.5  $\mu$ g ( $n = 7$  instead of  $n = 11$ ), since a very high rate of luteolytic failure was expected to occur in those groups. The animals that were not detected in estrus during the first 5 days after sponge removal were not treated with cloprostenol, and they were eliminated from the study.

Jugular blood samples were obtained in heparinized tubes immediately before cloprostenol was administered (time 0), and at 12, 24, 48 and 72 h after treatment. The samples were centrifuged for plasma separation and stored at  $-20$  °C until assayed for progesterone using a solid-phase radioimmunoassay kit (Coat-A-Count P4; Siemens Medical Solutions, Los Angeles, CA), that has been validated for ewes (Padmanabhan et al., 1995). The sensitivity of the assay was 0.02 ng/mL, the intra and inter-assay coefficients of variation were 7.4 and 4.9% respectively.

### 2.3. Definitions

Complete luteolysis in response to cloprostenol was considered to have occurred if progesterone concentrations decreased to less than 1 ng/mL within 24 h after treatment and remained at basal levels until 72 h post-treatment (Herrera et al., 1990; Hernández-Cerón et al., 2001). Any other progesterone profile was classified as luteolytic failure. The failures were further classified as minimal response, transient progesterone decline or delayed response: Minimal response to cloprostenol was assumed when progesterone concentrations never fell below 1 ng/mL during the first 72 h after treatment, even if some fluctuation was observed during that period. Transient progesterone decline was defined as a decrease in progesterone concentrations below 1 ng/mL within the first 12–24 h after treatment, followed by recovery to more than 1 ng/mL at 24, 48 or 72 h, a response called “partial luteolysis” by other



ovulation. A finding shared by those two studies was that the ewes that failed to complete luteolysis had higher progesterone concentrations before the treatment than those that responded with complete luteolysis, thus suggesting a luteoprotective effect of progesterone. A direct luteoprotective role of this hormone has been postulated in the rat (Goyeneche et al., 2003), the cow (Okuda et al., 2004), the ewe (Davis et al., 2010) and the sow (Diaz et al., 2011). Alternatively, non-genomic effects of progesterone on the oxytocin-signalling elements of the endometrial cells could interfere with the endogenous endometrial release of PGF<sub>2</sub>α that often occurs after exogenous administration of the hormone (Bishop and Stormshak, 2006; Bogacki et al., 2002; Grazzini et al., 1998) and that may help to complete luteolysis when reduced doses of exogenous PGF<sub>2</sub>α are used (Wade and Lewis, 1996). However, to our knowledge there are no studies designed to compare the effects of pre-treatment progesterone concentrations on the luteolytic efficiency of reduced doses of PGF<sub>2</sub>α in the ewe.

Cloprostenol, is currently the most widely used PGF<sub>α</sub> analogue for estrus synchronization in the ewe (Abecia et al., 2011; Amiridis and Cseh, 2012; Fierro et al., 2013). The use of different reduced doses of cloprostenol can be useful to identify differences in luteal sensitivity due either to the stage of the luteal phase or to the initial progesterone concentrations. It has been known for some time that both in ewes and in cows the administration of a reduced, sub-luteolytic dose of either PGF<sub>2</sub>α or cloprostenol can result in one of three general types of response (Juengel et al., 2000; Colazo et al., 2002; Trevisol et al., 2015). 1- In some animals there is not a significant alteration in progesterone concentrations after administration of the sub-luteolytic dose, indicating very low sensitivity. 2- Animals with intermediate sensitivity may show a significant but transient decline in progesterone concentrations, which return to pre-treatment levels within 24–48 h after treatment. 3- Animals with higher than average sensitivity experience rapid, complete and irreversible luteolysis after administration of a reduced dose that would not be luteolytic for most ewes.

The proportion of animals with each type of response to reduced doses of cloprostenol can be useful to identify differences in CL sensitivity between stages of the luteal phase, and may also help to explain differences in the luteolytic efficacy of a full dose. Also, a dose resulting in close to 50% effective luteolysis and 50% luteolytic failure could allow for the identification of differences between the animals that respond or not with complete luteolysis to such a dose. Therefore, the objectives of this study were to compare the luteolytic response to different reduced doses of cloprostenol administered on day 6 or day 9 post-estrus, and to evaluate the effect of initial progesterone concentration on the luteolytic efficacy of the treatment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Ethics and preparation of the animals

The experiment was conducted at an experimental farm in the Central Plateau of Mexico. The protocol was approved by the Institutional Committee for the Care and Use of Experimental Animals of the Faculty of Veterinary Medicine of the National Autonomous University of Mexico, according to Mexican Official Norm NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA, 2001). Eighty adult, mixed-breed ewes were initially used. The ewes were feed on pasture and supplemented with concentrate according to requirements. Before the onset of the experiment they were synchronized with an intravaginal sponge impregnated with 20 mg of fluorogestone acetate (Chronogest, MSD Animal Health, Mexico) that remained in place for 7–9 days. At the time of sponge removal the ewes were treated with 250 IU of eCG (Folligon, MSD Animal Health, Mexico) and 125 µg of cloprostenol (Celosil, MSD Animal Health, Mexico).

### 2.2. Experimental design

After withdrawal of the sponges, estrus was detected using intact rams fitted with an apron to prevent mating. Each ewe was assigned at the time of sponge removal to one of eight cloprostenol-treatment groups. In four groups the ewes that showed estrus were treated on day 6 post-estrus with either 7.5, 12.5, 25 or 50 µg of cloprostenol/ewe, and in the other four groups the same treatments were administered on day 9 post-estrus. Initial assignment to the groups was random with the exception that fewer animals were assigned to the groups treated with 7.5 µg (n = 7 instead of n = 11), since a very high rate of luteolytic failure was expected to occur in those groups. The animals that were not detected in estrus during the first 5 days after sponge removal were not treated with cloprostenol, and they were eliminated from the study.

Jugular blood samples were obtained in heparinized tubes immediately before cloprostenol was administered (time 0), and at 12, 24, 48 and 72 h after treatment. The samples were centrifuged for plasma separation and stored at –20 °C until assayed for progesterone using a solid-phase radioimmunoassay kit (Coat-A-Count P4; Siemens Medical Solutions, Los Angeles, CA), that has been validated for ewes (Padmanabhan et al., 1995). The sensitivity of the assay was 0.02 ng/mL, the intra and inter- assay coefficients of variation were 7.4 and 4.9% respectively.

### 2.3. Definitions

Complete luteolysis in response to cloprostenol was considered to have occurred if progesterone concentrations decreased to less than 1 ng/mL within 24 h after treatment and remained at basal levels until 72 h post-treatment (Herrera et al., 1990; Hernández-Cerón et al., 2001). Any other progesterone profile was classified as luteolytic failure. The failures were further classified as minimal response, transient progesterone decline or delayed response: Minimal response to cloprostenol was assumed when progesterone concentrations never fell below 1 ng/mL during the first 72 h after treatment, even if some fluctuation was observed during that period. Transient progesterone decline was defined as a decrease in progesterone concentrations below 1 ng/mL within the first 12–24 h after treatment, followed by recovery to more than 1 ng/mL at 24, 48 or 72 h, a response called “partial luteolysis” by other



authors (Atli et al., 2012; Colazo et al., 2002). Delayed response occurred if progesterone concentrations first declined below 1 ng/mL at 48 or more hours after cloprostenol administration.

#### 2.4. Statistical analysis

Fisher's exact tests were used to compare the proportion of ewes with complete luteolysis or with luteolytic failure in response to different doses of cloprostenol administered on different days post-estrus, to compare the proportion of ewes with different types of luteolytic failure between groups, and to compare the proportion of ewes with complete luteolysis according to their pre-treatment progesterone concentrations. Differences in progesterone concentrations between groups at different times were analysed by three-way ANOVA for repeated measures. The independent variables were the stage at which cloprostenol was administered (day 6 or 9), the dose of cloprostenol (7.5, 12.5, 25 or 50 µg/mL), and the time of sampling after cloprostenol administration (0, 12, 24, 48 or 72 h). The effect of the ewe was nested within the interaction between stage and dose. Differences between treatments at different times were analysed using Bonferroni's multiple comparisons. Two-way ANOVA for repeated measures was used to compare the progesterone concentrations at different times between animals that had complete luteolysis and those with luteolytic failure within the 25-µg group. A regression analysis was also carried out to evaluate the relation between the concentrations of progesterone immediately before treatment and the percentage of progesterone decline 12 h after treatment in the ewes that received 25 µg of cloprostenol.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Animals contributing data

Four animals were not detected in estrus after removal of the sponges and were eliminated from their assigned groups. Another 5 ewes were retrospectively found to have had less than 1 ng/mL of progesterone before cloprostenol administration (time 0) and were eliminated from the study because they lacked a functional CL at the time of treatment. Thus, Table 1 shows the number of ewes that contributed data to this study.

#### 3.2. Luteolytic response to different doses

As expected, dose had a significant effect on the proportion of ewes completing luteolysis within 24 h after treatment ( $p < 0.05$ ). In contrast, there was no effect of day of cloprostenol administration (Table 2). When animals treated at either day 6 or 9 post-estrus were considered together, the proportion of ewes completing luteolysis after cloprostenol administration was significantly larger ( $p < 0.05$ ) in the groups treated with 25 or 50 µg than in groups treated with smaller doses (Table 2). The highest rate of complete luteolysis was found when 50 µg were administered.

The most common type of luteolytic failure after administration of 7.5 or 12.5 µg of cloprostenol was characterized by a minimal response to PGF2 $\alpha$ . This type of failure was less common with higher doses (Table 3). Treatment with 25 µg resulted more commonly in transient progesterone decline. In the groups treated with 50 µg there was only one case of minimal response and one of transient progesterone decline; the other two cases of "luteolytic failure" with this dose were actually cases in which luteolysis did occur, but after an interval that was too long for luteolysis to be considered a direct response to the treatment.

It must be pointed out that the absence of a non-treated control group does not permit to determine if the fluctuations in daily progesterone concentrations observed in animals classified as having a "minimal response" were in any way different to the fluctuations that are known to occur during the luteal phase (Zarco et al., 1988). Mean progesterone concentrations at 12 h post-treatment were significantly higher ( $p < 0.05$ ) in the "minimal response" group ( $2.65 \pm 0.3$  ng/mL) than in the "transient progesterone decline" group ( $0.85 \pm 0.34$  ng/mL). However, many animals in the "minimal response" group did experience a moderate reduction in progesterone concentrations during the first 12 h post-treatment, so that in the context of this study "minimal response" should only be taken to mean that progesterone concentrations never declined below 1 ng/mL within the 72-h sampling period.

Even the smallest dose used in this study resulted in complete luteolysis in some animals, indicating that they were very sensitive to PGF2 $\alpha$ . As the dose increased, the proportion of ewes with complete luteolysis also increased, while the proportion of animals with minimal response decreased. Also, as the dose increased from 7.5 to 25 µg, more animals showed a transient progesterone decline,

**Table 1**  
Number of ewes with a functional CL (progesterone concentrations  $\geq 1$  ng/mL) before administration of each treatment.

Dose of cloprostenol (µg/ewe)	Stage of luteal phase		
	Early	Middle	Total
7.5	7	6	13
12.5	11	11	22
25.0	8	10	18
50.0	9	9	18
Total	35	36	71

**Table 2**  
Luteolytic efficiency of cloprostenol administered on day 6 or day 9 post-estrus.

	Dose of cloprostenol			
	7.5 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg
Ewes treated on day 6	7	11	8	9
Complete luteolysis	1 (14.3%) <sup>a</sup>	2 (18.2%) <sup>a</sup>	4 (50.0%) <sup>ab</sup>	7 (77.8%) <sup>b</sup>
Ewes treated on day 9	6	11	10	9
Complete luteolysis	0 (0.0%) <sup>a</sup>	0 (0.0%) <sup>a</sup>	4 (40.0%) <sup>ab</sup>	7 (77.8%) <sup>b</sup>
All ewes (day 6 + 9)	13	22	18	18
Complete luteolysis	1 (7.7%) <sup>a</sup>	2 (9.1%) <sup>a</sup>	8 (44.4%) <sup>b</sup>	14 (77.8%) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Within a given row, values that do not share at least one common letter are significantly different ( $p < 0.05$ ). There were no significant differences between day of treatment ( $p > 0.05$ ).

**Table 3**  
Classification of luteolytic failures according to type of response.

	Dose of Cloprostenol			
	7.5 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg
All ewes (day 6 + 9)	13	22	18	18
Minimal response	9 (69.2%) <sup>c</sup>	13 (59.1%) <sup>bc</sup>	3 (16.7%) <sup>ab</sup>	1 (5.6%) <sup>ab</sup>
Transient P4 decline	3 (23.7%) <sup>ab</sup>	7 (31.8%) <sup>bc</sup>	7 (38.9%) <sup>bc</sup>	1 (5.6%) <sup>ab</sup>
Delayed response	0 (0.0%) <sup>a</sup>	0 (0.0%) <sup>a</sup>	0 (0.0%) <sup>a</sup>	2 (11.2%) <sup>ab</sup>

<sup>a,b,c</sup> Values that do not share at least one common letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

indicating that small and intermediate doses can initiate luteolysis in some animals, even though they are not able to finish the process. These results suggest that response to cloprostenol is not an all or none phenomenon, and that individual animals have different sensitivities to the hormone. Transient decline in progesterone in response to small/intermediate doses of cloprostenol likely occurs in animals with intermediate CL sensitivity to PGF2 $\alpha$ . A similar transient decline in progesterone concentrations has been observed after treatment with reduced doses of cloprostenol in heifers (Colazo et al., 2002) and cows (Trevisol et al., 2015). It has been suggested that these reduced doses may act on the endothelial cells of the CL, but not on the luteal cells themselves, and that differences in luteal cell sensitivity could explain differences in response to the same reduced dose (Colazo et al., 2002). Atli et al. (2012) studied gene-expression in the CL of cows exposed to low-dose pulses of PGF2 $\alpha$ . They found that a putatively non-luteolytic pattern of pulses led, as expected, to partial luteolysis (transient progesterone decline) in some animals. However, the same treatment unexpectedly resulted in complete CL regression in other animals. The initial changes in gene expression were similar in all animals, but subsequent changes in mRNA concentrations indicated a higher sensitivity of the luteolytic pathway in the animals that completed luteolysis. Also, the concentration of mRNA for some steroidogenic enzymes, angiogenic factors and PGF2 $\alpha$ -inactivation enzymes that may protect or maintain luteal function, were higher in animals with transient progesterone decline than in the ewes that completed luteolysis (Atli et al., 2012).

A transient decline in progesterone concentrations is normally observed after the first PGF2 $\alpha$  pulse during natural luteolysis in the ewe (Zarco et al., 1988), and it can also be induced by the administration of a very small exogenous PGF2 $\alpha$  pulse mimicking a natural one (McCracken et al., 2012). During natural luteolysis this transient decline is followed by a second PGF2 $\alpha$  pulse occurring several hours after the first one, and by subsequent higher-frequency pulses that result in luteolysis completion (Zarco et al., 1988). Failure to secrete enough pulses or to secrete them at the appropriate frequency can result in complete recovery of the CL followed by long-term CL persistence (Zarco et al., 1984). McCracken et al. (2012) demonstrated that there are differences in sensitivity between animals, with different individuals requiring three, four or five small exogenous pulses of PGF2 $\alpha$  to avoid CL recovery after a transient progesterone decline. The proportion of ewes completing luteolysis increased as the number of exogenous pulses also increased, and reached the maximum when five pulses were administered (McCracken et al., 2012), indicating that even the less sensitive CL can be destroyed if enough pulses are administered. Similarly, in the present study there was an increase in the number of animals which completed luteolysis as the dose of cloprostenol increased, and the highest dose resulted in the highest proportion of animals with complete luteolysis at the expense of both animals with minimal response and animals with transient progesterone decline. This indicates that reducing the dose of a single cloprostenol injection increases the proportion of CL recoveries just as reducing the number of very small pulses of PGF2 $\alpha$  would do (McCracken et al., 2012). In contrast, a high enough dose of cloprostenol will induce complete luteolysis even in those animals with reduced CL sensitivity, i.e. in the type of animal that would have required a large number of endogenous PGF2 $\alpha$  pulses during natural luteolysis.

### 3.3. Progesterone profiles

As shown in Fig. 1, initial progesterone concentrations were similar between groups, and all groups showed a significant decrease



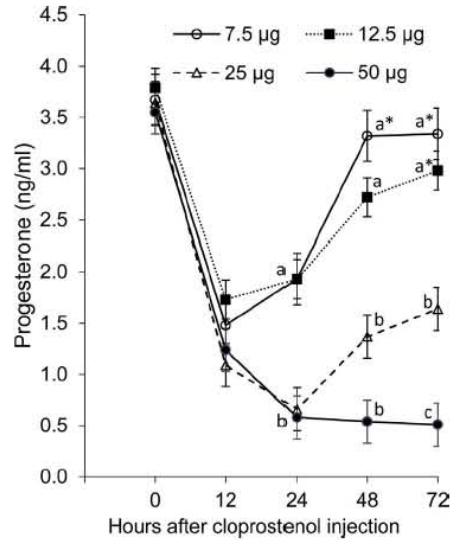


Fig. 1. Progesterone concentrations at different times after the administration of 7.5, 12.5, 25 or 50 µg of cloprostenol. There were no differences between groups at 0 and 12 h. Afterwards, values with different letters at a given time indicate significant differences between groups ( $p < 0.05$ ). Asterisks indicate periods when progesterone concentrations were no longer different from the initial concentrations for the group ( $p > 0.05$ ).

at 12 h post-treatment ( $p < 0.05$ ), even though the mean concentrations at that time remained above 1 ng/mL in all groups. Subsequent changes differed between groups treated with different doses, reflecting the proportion of ewes with each type of response within each group.

In ewes treated with 7.5 or 12.5 µg the mean progesterone concentrations never decreased below 1 ng/mL because there was a large proportion of animals with minimal response in those groups. Besides, mean concentrations began to recover at 24 h as progesterone rebounded in animals with transient decline. As a result, progesterone concentrations were no longer different from the initial concentrations after 48 h in ewes treated with 7.5 µg and after 72 h in the group treated with 12.5 µg.

In ewes treated with 25 µg the mean progesterone concentrations decreased below 1 ng/mL at 24 h post-treatment, rebounding after 48 h as some animals recovered from a transient decline, but the mean concentrations continued to be significantly lower than the initial concentrations for the group due to the presence of several animals that completed luteolysis.

In ewes treated with 50 µg the concentrations of progesterone declined below 1 ng/mL by 24 h and continued below this level at 48 and 72 h, being at all times significantly lower than the initial concentrations for the group ( $p < 0.05$ ), reflecting the fact that in this group most animals experienced complete luteolysis.

### 3.4. Luteoprotective effect of progesterone

It has been suggested that studying animals with different responses to the same borderline luteolytic treatment can provide valuable information regarding the causes of differential CL sensitivity (Adi et al., 2012; McCracken et al., 2012). In the present study the dose of 25 µg resulted in close to 50% luteolytic efficacy. Thus, this group was used to evaluate the possible effects of the initial progesterone concentrations on the response to cloprostenol. To do this, pre- and post-treatment progesterone concentrations were compared between the ewes treated with 25 µg that completed luteolysis and those that experienced luteolytic failure after the same dose. It was found that pre-treatment progesterone concentrations were significantly lower ( $p < 0.05$ ) in the ewes that successfully

Table 4

Progesterone (P4) concentrations at different times after the administration of 25 µg of cloprostenol in ewes that completed luteolysis and ewes experiencing luteolytic failure.

Time (h)	Ewes with complete luteolysis (n = 8)		Ewes with luteolytic failure (n = 10)	
	P4 (ng/mL)	% of initial value	P4 (ng/mL)	% of initial value
0	2.26 ± 0.24 <sup>bc</sup>	100%	4.76 ± 0.22 <sup>d</sup>	100%
12	0.19 ± 0.24 <sup>a</sup>	8.4%	1.81 ± 0.22 <sup>b</sup>	38.0%
24	0.03 ± 0.24 <sup>a</sup>	1.3%	1.17 ± 0.22 <sup>b</sup>	24.6%
48	0.04 ± 0.24 <sup>a</sup>	1.8%	2.44 ± 0.22 <sup>bc</sup>	51.2%
72	0.17 ± 0.24 <sup>a</sup>	7.5%	2.82 ± 0.22 <sup>c</sup>	59.2%

<sup>a,b,c,d</sup> Values that do not share at least one common letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).



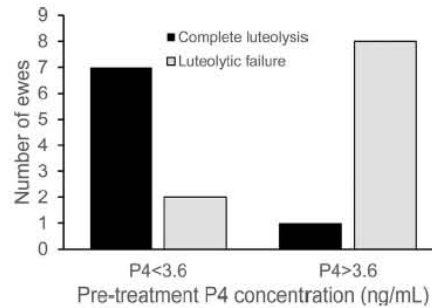


Fig. 2. Completion of luteolysis and luteolytic failure in ewes that had progesterone concentrations above or below the mean value for the group (3.6 ng/mL) immediately before the administration of 25  $\mu$ g of cloprostenol. The distribution of responses was different between groups ( $p < 0.05$ ).

completed luteolysis than in those poised for luteolytic failure (Table 4).

The animals with low initial progesterone concentrations responded to cloprostenol with an immediate reduction to less than 10% of the initial concentrations, followed by further reduction until less than 2% of the initial progesterone concentrations remained. In contrast, high initial progesterone concentrations apparently had a luteoprotective effect against cloprostenol because the ewes that failed to complete luteolysis not only had higher ( $p < 0.05$ ) initial progesterone concentrations, but by 12 h after treatment they had only declined to 38% of the initial levels. A regression analysis of the data from all the ewes treated with 25  $\mu$ g of cloprostenol revealed that there was a negative correlation ( $r = -0.57$ ;  $p < 0.01$ ) between the concentrations of progesterone immediately before treatment and the percentage of progesterone decline 12 h after treatment, indicating that the initial sensitivity of the CL to a reduced dose of cloprostenol decreased as progesterone concentrations at the time of treatment were higher.

As shown in Fig. 2, almost all the animals with initial progesterone concentrations above the mean initial value for the group (3.6 ng/mL) experienced luteolytic failure, while all but two of the ewes with initial concentration below the mean for the group completed luteolysis. An apparent luteoprotective effect of progesterone in the ewe has been suggested before, as both Herrera et al. (1990) and Hernández-Cerón et al. (2001) reported that the animals with luteolytic failure after receiving a regular dose of natural PGF2 $\alpha$  were the ones with the highest pre-treatment progesterone concentrations. Results of the present study suggest an even larger role of progesterone when reduced doses of cloprostenol are administered. Table 4 shows that by 12 h after treatment with 25  $\mu$ g of cloprostenol the concentrations of progesterone in the ewes poised for luteolytic failure were 10 times higher than those in ewes destined for complete luteolysis. This large difference was the combined result of higher initial concentrations and smaller proportional declines after treatment in the ewes poised for luteolytic failure. Thus, it would appear that the initial luteoprotective effect of high progesterone concentrations is self-reinforcing, as it permits that relatively high progesterone levels continue protecting the CL hours after the administration of a reduced dose of a luteolytic agent. This may have an important inhibitory effect on the subsequent cascade of events required for completion of luteolysis.

The luteoprotective effect of progesterone was not a function of the stage of the luteal phase at the time of treatment. Thus, in the present study the differences in initial progesterone concentrations and in post-treatment profiles between ewes that completed luteolysis and those with luteolytic failure were present both on day 6 and on day 9 (Fig. 3). Also, the effect has been found before in ewes that were injected with PGF2 $\alpha$  between days 7 and 10 (Herrera et al., 1990) and between days 5 and 6 post-ovulation (Hernández-Cerón et al., 2001). The lower luteolytic response to commercial doses of PGF2 $\alpha$  that has sometimes been reported in ewes that are at the mid-luteal phase (Herrera et al., 1990) might be due more to a higher proportion of ewes with elevated progesterone concentrations at that stage than to the stage itself.

High progesterone concentrations may directly protect the CL since increased intraluteal concentrations of progesterone interfere with OT signalling in ovine small luteal cells and with PGF2 $\alpha$  signalling on ovine large luteal cells (Davis et al., 2010). Also, progesterone suppresses apoptosis of luteal cells in the cow (Okuda et al., 2004), and it is able to inhibit the luteal PGF2 $\alpha$  production that occurs in response to both endometrially produced and exogenously administered PGF2 $\alpha$  (Díaz et al., 2002). Luteal PGF2 $\alpha$  production may be part of a self-amplification, positive feedback mechanism to insure completion of luteolysis after it is initiated by PGF2 $\alpha$  of endometrial origin (Kumagai et al., 2014; Tsai and Wiltbank, 1997; Wiltbank and Ottobre, 2003), and it could also help to complete luteolysis after administration of reduced doses of the hormone or its analogues (Atli et al., 2012; Contreras-Solis et al., 2009; Tsai and Wiltbank, 1997).

High progesterone could also interfere with another putative self-amplification mechanism which may help to complete the process of luteolysis initiated by a sub-luteolytic dose of PGF2 $\alpha$  or one of its analogues (Kotwica et al., 1998). In this mechanism, the administration of PGF2 $\alpha$  would be followed by oxytocin-mediated pulsatile release of PGF2 $\alpha$  by the uterus until luteolysis is completed (Duong et al., 2012; Kotwica et al., 1998; Wade and Lewis, 1996). It has been demonstrated that progesterone inhibits, through non-genomic mechanisms, the binding of oxytocin (OT) to its endometrial receptor, decreasing uterine PGF2 $\alpha$  secretion both in the ovine (Bishop and Stormshak, 2006) and the bovine (Bogacki et al., 2002). There is also experimental evidence of this type of interference by progesterone in pregnant mares, where administration of cloprostenol causes an endogenous release of PGF2 $\alpha$  which leads to completion of luteolysis (Daels et al., 1995), but that can be blocked by exogenous administration of progesterone or by administration of the progestogen altrenogest, both of which can prevent completion of luteolysis even after repeated injection of

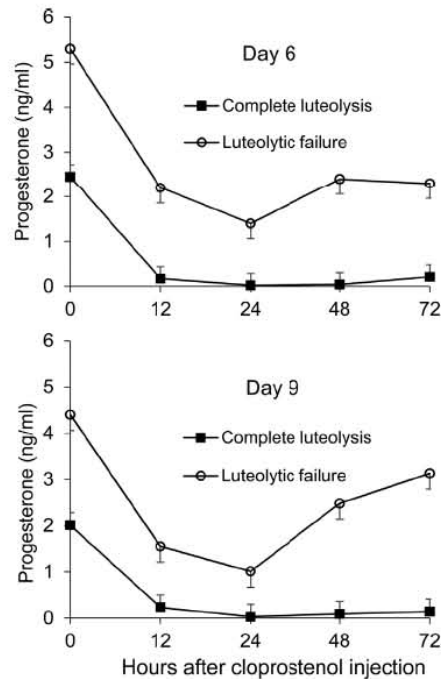


Fig. 3. Progesterone concentrations on ewes completing luteolysis or experiencing luteolytic failure after treatment with 25  $\mu$ g of cloprostenol during the early or mid-luteal phase. At both stages of the luteal phase the pre-treatment (time 0) and post-treatment progesterone concentrations were higher ( $p < 0.05$ ) in the ewes that failed to complete luteolysis.

cloprostenol (Daels et al., 1996). It has also been suggested that part of the luteoprotective effect of eCG against PGF2 $\alpha$  in the pregnant mare is due to the increased luteal progesterone production induced by eCG (Flores-Flores et al., 2014).

In the present study, the group treated with 50  $\mu$ g of cloprostenol was the only one in which some animals completed luteolysis 48 h or more after treatment (Table 3). In these ewes the concentrations of progesterone remained above 1 ng/m before suddenly falling to baseline levels. It is unlikely that such a sudden luteal regression could have been directly caused by cloprostenol that was administered two or three days earlier. Also, and even though the lack of a control group prevents direct confirmation, it is unlikely that luteal regression in these animals would have resulted from natural luteolysis at the end of diestrus, since they were between day 11 and 12 of the cycle when luteolysis finally occurred, a time that is too early for natural luteal regression even in ewes with shorter than average cycles (Zarco et al., 1988). Instead, these results support the hypothesis that an auto-amplification mechanism involving endogenous PGF2 $\alpha$  production might be important for completion of luteolysis when reduced doses of exogenous PGF2 $\alpha$  are injected (Contreras-Solis et al., 2009). Even though this mechanism can be blocked by high progesterone concentrations when small-enough doses of cloprostenol are used, the blockade could be overridden by a dose, such as 50  $\mu$ g/ewe, that would be large enough to initiate the self-amplification mechanism(s) that can eventually result in completion of luteolysis. Smaller doses can directly and rapidly induce luteolysis in some animals, especially in those with relatively low progesterone concentrations at the time of treatment, but are apparently not able to initiate an effective self-amplification mechanism that would allow for additional animals experiencing luteolysis more than 24 h after treatment.

### 3.5. Practical implications

As described above, even though a dose as small as 50  $\mu$ g/ewe of cloprostenol can result in a large proportion of animals finally experiencing luteolysis, in some of these animals luteolysis may not be caused directly by the exogenous hormone but by an auto-amplification mechanism that might result in a variable delay of up to 72 h before completion. Thus, the degree of estrus synchronization achieved with this kind of reduced dose will probably not be as good as that caused by a higher dose resulting in immediate luteolysis in all treated animals. Colazo et al. (2002), working with heifers, also suggested that small doses of cloprostenol result in variation in the response that could depend on CL sensitivity.

### 3.6. Conclusions

It is concluded that high progesterone concentrations at the time of treatment are associated with a reduction in sensitivity to



reduced doses of cloprostenol in ewes. This luteoprotective effect of progesterone is independent of the stage of the luteal phase and may be a significant cause of variability in the response to reduced doses of cloprostenol.

#### Conflicts of interest

None.

#### Funding

This work was supported by a grant from DGAPA-UNAM [PAPIIT grant No. IN213915]. Luz María Granados-Villarreal was supported by a scholarship from CONACYT, México. These sponsors played no role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the article for publication.

#### Acknowledgement

The authors thank Clara Murcia for progesterone determinations.

#### References

- Abecia, J.A., Forcada, F., González-Bulnes, A., 2011. Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.* 27, 67–79.
- Acritopoulou, S., Haresign, W., Foster, J.P., Lamming, G.E., 1977. Plasma progesterone and LH concentrations in ewes after injection of an analogue of prostaglandin F<sub>2α</sub>. *J. Reprod. Fertil.* 49, 337–340.
- Amiridis, G.S., Cseh, S., 2012. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 130, 152–161.
- Atli, M.O., Bender, R.W., Mehta, V., Bastos, M.R., Luo, W., Vezina, C.M., Wiltbank, M.C., 2012. Patterns of gene expression in the bovine corpus luteum following repeated intrauterine infusions of low doses of prostaglandin F<sub>2α</sub>. *Biol. Reprod.* 86 (130), 1–13.
- Baird, D.T., Scaramuzzi, R.J., 1975. Prostaglandin F<sub>2α</sub> and luteal regression in the ewe: comparison with 16 aryloxyprostaglandin (I.C.I. 80,996). *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 15, 161–174.
- Bishop, C.V., Stormshak, F., 2006. Nongenomic action of progesterone inhibits oxytocin-induced phosphoinositide hydrolysis and prostaglandin F<sub>2α</sub> secretion in the ovine endometrium. *Endocrinology* 147, 937–942.
- Bogacki, M., Silvia, W.J., Rekawiecki, R., Kotwica, J., 2002. Direct inhibitory effect of progesterone on oxytocin-induced secretion of prostaglandin F<sub>2α</sub> from bovine endometrial tissue. *Biol. Reprod.* 67, 184–188.
- Colazo, M.G., Martínez, M.F., Kastelic, J.P., Mapletoft, R.J., 2002. Effects of dose and route of administration of cloprostenol on luteolysis: estrus and ovulation in beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 72, 47–62.
- Contreras-Solis, I., Vasquez, B., Diaz, T., Letelier, C., Lopez-Sebastian, A., Gonzalez-Bulnes, A., 2009. Ovarian and endocrine responses in tropical sheep treated with reduced doses of cloprostenol. *Anim. Reprod. Sci.* 114, 384–392.
- Daels, P.F., Mohammed, H., Montavon, S.M.N., Stabenfeldt, G.H., Hughes, J.P., Odensvik, K., Kindahl, H., 1995. Endogenous prostaglandin secretion during cloprostenol-induced abortion in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 40, 305–321.
- Daels, P.F., Besognet, B., Hansen, B., Mohammed, H., Odensvik, K., Kindahl, H., 1996. Effect of progesterone on prostaglandin F<sub>2α</sub> secretion and outcome of pregnancy during cloprostenol-induced abortion in mares. *Am. J. Vet. Res.* 57, 1331–1337.
- Davis, T.L., Bott, R.C., Slough, T.L., Bruemmer, J.E., Niswender, G.D., 2010. Progesterone inhibits oxytocin- and prostaglandin F<sub>2α</sub> stimulated increases in intracellular calcium concentrations in small and large ovine luteal cells. *Biol. Reprod.* 82, 282–288.
- Diaz, F.J., Anderson, L.E., Wu, Y.L., Rabot, A., Tsai, S.J., Wiltbank, M.C., 2002. Regulation of progesterone and prostaglandin F<sub>2α</sub> production in the CL. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191, 65–80.
- Diaz, F.J., Luo, W., Wiltbank, M.C., 2011. Effect of decreasing intraluteal progesterone on sensitivity of the early porcine corpus luteum to the luteolytic actions of prostaglandin F<sub>2α</sub>. *Biol. Reprod.* 84, 26–33.
- Duong, H.T., Vu, H.V., Bah, M.M., Woclawek-Potocka, I., Dam, T.V., Skarzynski, D.J., Okuda, K., Acosta, T.J., 2012. Acute changes in the concentrations of prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF) and cortisol in uterine and ovarian venous blood during PGF-induced luteolysis in cows. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 238–243.
- Fierro, S., Gil, J., Viñoles, C., Olivera-Muzante, J., 2013. The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. *Theriogenology* 79, 399–408.
- Flores-Flores, G., Velázquez-Cantón, E., Boeta, M., Zarco, L., 2014. Luteoprotective role of equine chorionic gonadotropin (eCG) during pregnancy in the mare. *Reprod. Domest. Anim.* 49, 420–426.
- Goyeneche, A.A., Deis, R.P., Gibori, G., Telleria, C.M., 2003. Progesterone promotes survival of the rat corpus luteum in the absence of cognate receptors. *Biol. Reprod.* 68, 151–158.
- Grazzini, E., Guillon, G., Mouillac, B., Zingg, H.H., 1998. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature* 392, 509–512.
- Hackett, A.J., Robertson, H.A., 1980. Effect of dose and time of injection of prostaglandin F<sub>2α</sub> in cycling ewes. *Theriogenology* 13, 347–351.
- Hernández-Cerón, J., Valencia, M.J., Zarco, Q.L., 2001. Regresión del cuerpo lúteo y presentación del estro en ovejas con dos inyecciones de prostaglandina con 8 días de intervalo. *Rev. Mex. Cienc. Pec.* 39, 53–58.
- Herrera, H.L., Feldman, S.D., Zarco, Q.L., Valencia, M.J., Ortíz, H.A., Angeles, C.S., 1990. Evaluación del efecto luteolítico de la prostaglandina F<sub>2α</sub> en diferentes días del ciclo estral de la borrega. *Vet. Mex.* 21, 143–147.
- Juengel, J.L., Haworth, J.D., Rollyson, M.K., Silva, P.J., Sawyer, H.R., Niswender, G.D., 2000. Effects of dose of prostaglandin F<sub>2α</sub> on steroidogenic components and oligonucleosomes in ovine luteal tissue. *Biol. Reprod.* 62, 1047–1051.
- Kotwica, J., Skarzynski, D., Jaroszewski, J., Williams, G.L., Bogacki, M., 1998. Uterine secretion of prostaglandin F<sub>2α</sub> stimulated by different doses of oxytocin and released spontaneously during luteolysis in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 38, 217–226.
- Kumagai, A., Yoshioka, S., Sakumoto, R., Okuda, K., 2014. Auto-amplification system for prostaglandin F<sub>2α</sub> in bovine corpus luteum. *Mol. Reprod. Dev.* 81, 646–654.
- McCracken, J.A., Custer, E.E., Schreiber, D.T., Tsang, P.C.W., Keator, C.S., Arosh, J.A., 2012. A new in vivo model for luteolysis using systemic pulsatile infusions of PGF<sub>2α</sub>. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 97, 90–96.
- Okuda, K., Korzekwa, A., Shibaya, M., Murakami, S., Nishimura, R., Tsubouchi, M., Woclawek-Potocka, I., Skarzynski, D.-J., 2004. Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells. *Biol. Reprod.* 71, 2065–2071.
- Padmanabhan, V., Evans, N.P., Dahl, G.E., McFadden, K.L., Mauger, D.T., Karsch, F.J., 1995. Evidence for short or ultrashort loop negative feedback of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Neuroendocrinology* 62, 248–258.
- SAGARPA, 2001. Norma Oficial Mexicana-NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Diario Oficial de la Federación. México. 08/22/2001 pp. 20–74.
- Silva, P.J., Juengel, J.L., Rollyson, M.K., Niswender, G.D., 2000. Prostaglandin metabolism in the ovine corpus luteum: catabolism of prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) coincides with resistance of the corpus luteum to PGF<sub>2α</sub>. *Biol. Reprod.* 63, 1229–1236.

- Treviñal, E., Ferreira, J.C., Ankersmann, C.L., Destro, F.C., Marques Filho W.C., Carmogno, A.S., Bichi, M.V., do Amaral, J.R., Damoija, J.C.P., Sartori, R., Ferreira, J.C.D., 2015. Luteal changes after treatment with sub-luteolytic doses of prostaglandin (Claprostenol sodium) in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 153, 8–12.
- Tsai, S.J., Wilbank, M.C., 1997. Prostaglandin F2 $\alpha$  induces expression of prostaglandin G/H synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback. *Biol. Reprod.* 57, 1016–1022.
- Wade, D.E., Lewis, G.S., 1996. Exogenous prostaglandin F2 $\alpha$  stimulates utero-ovarian release of prostaglandin F2 $\alpha$  in sheep: a possible component of the luteolytic mechanism of action of exogenous prostaglandin F2 $\alpha$ . *Domest. Anim. Endocrinol.* 13, 383–393.
- Wilbank, M.C., Ottobre, J.S., 2003. Regulation of intraluteal production of prostaglandins. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10 (1), 91.
- Zarco, I., Suthenfeldt, G.H., Kindahl, H., Quirk, J.F., Granstrom, P., 1984. Persistence of luteal activity in the non-pregnant ewe. *Anim. Reprod. Sci.* 7, 245–267.
- Zarco, I., Suthenfeldt, G.H., Quirk, J.F., Kindahl, H., Bradford, G.R., 1988. Release of prostaglandin F2- $\alpha$  and the timing of events associated with luteolysis in ewes with oestrous cycles of different lengths. *J. Reprod. Fert.* 83, 517–526.

*“Negar un hecho es lo más fácil del mundo. Mucha gente lo hace, pero el hecho sigue siendo un hecho”*

*Issac Asimov*

## **CAPITULO 4**

### **PERIODO CRÍTICO PARA COMPLETAR LA LUTEOLISIS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA DOSIS REDUCIDA DE CLOPROSTENOL EN LA OVEJA.**

Artículo en preparación

#### **Resumen**

El objetivo de la presente investigación fue caracterizar la respuesta inicial del cuerpo lúteo a la administración de una dosis reducida de cloprostenol e identificar el momento en el que se define si un animal experimentará o no luteolisis completa en respuesta a dicha dosis. Se utilizaron 28 ovejas adultas que fueron asignadas al azar a uno de tres grupos que recibieron diferentes tratamientos en el día 9 de la fase lútea: El grupo 250  $\mu\text{g}$  (n=8) estuvo conformado por ovejas a las que se les administró una dosis de 250  $\mu\text{g}$  de cloprostenol; el grupo 10  $\mu\text{g}$  (n=15), conformado por ovejas tratadas con una dosis reducida de 10  $\mu\text{g}$  de cloprostenol; el grupo testigo, a cuyas integrantes se les aplicó 1 ml de solución salina, (n=5). Se obtuvieron muestras sanguíneas de todas las ovejas antes de la inyección con cloprostenol o con solución salina (tiempo 0), cada dos horas durante las primeras 24 horas después del tratamiento, y posteriormente a las 36, 48 y 72 horas. Para evaluar las diferencias en las concentraciones de progesterona entre y dentro de grupos se realizó un análisis de varianza para mediciones repetidas. El 100 % de las ovejas del grupo 250  $\mu\text{g}$  experimentaron luteolisis completa, lo que ocurrió en solo 36% (4/11) de las ovejas tratadas con 10  $\mu\text{g}$ , siendo estas proporciones significativamente distintas ( $p < 0.05$ ). En ambos grupos se produjo una reducción similar de las concentraciones de progesterona durante las primeras 12 horas post tratamiento, pero entre 14 y 18 horas después del tratamiento las concentraciones de progesterona se comenzaron a recuperar en las ovejas del grupo 10  $\mu\text{g}$  que no completaron la luteolisis. Se sugiere la existencia de un período crítico, localizado entre 12 y 18 horas post-inyección, en el que se define la suerte de los cuerpos lúteos de animales tratados con dosis reducidas de cloprostenol.

#### **Introducción**

Los efectos luteolíticos del tratamiento con prostaglandina  $F2\alpha$  o sus análogos sintéticos se han estudiado en diferentes especies (Diaz *et al.* 2013; Fierro *et al.* 2017; Talbott *et al.* 2017; Liu *et al.* 2017). Después de la administración de una dosis luteolítica de estas sustancias se produce una rápida

disminución en las concentraciones circulantes de progesterona (Répasi *et al.* 2005; El Sherry *et al.* 2013). Esta disminución puede observarse dentro de las primeras 9 horas después del tratamiento con diferentes dosis de PGF $2\alpha$  administradas como una infusión intrauterina (Thorburn y Nicol. 1971; Atli *et al.* 2012), y dentro de las primeras 4 horas después de la administración intramuscular de distintas dosis de PGF $\alpha$  natural (dinoprost) o de su análogo sintético cloprostenol (El Sherry *et al.* 2013). Sin embargo, el comportamiento posterior de las concentraciones de progesterona varía dependiendo de la dosis administrada y de la sensibilidad individual de los animales (Juengel *et al.* 2000; Granados-Villarreal *et al.* 2017).

Durante la luteolisis natural en la oveja, el intervalo entre el primer pulso de la PGF $2\alpha$  y el comienzo de la luteolisis (reducción significativa en las concentraciones de progesterona) es de aproximadamente 9 horas, mientras que el intervalo entre el comienzo y el final de la luteólisis es de alrededor de 20 horas (Zarco *et al.* 1988). La respuesta inicial al primer pulso es similar en ovejas con ciclos estrales de diferente longitud, pero el tiempo requerido para completar la luteolisis depende del número y la frecuencia de los pulsos subsecuentes de la PGF $2\alpha$  (Zarco *et al.* 1988). Esto sugiere que posiblemente exista un período crítico durante el cual se determina la suerte de un cuerpo lúteo que ha iniciado el proceso de luteólisis. Si en ese periodo se presentan pulsos adicionales de la PGF $2\alpha$  durante la luteólisis natural el cuerpo lúteo puede continuar con el proceso de luteolisis hasta completarlo. En cambio, la ausencia de pulsos endógenos adicionales permitiría la recuperación de la función lútea después de una disminución transitoria en las concentraciones de progesterona.

Granados-Villarreal *et al.* (2017) sugirieron que una dosis pequeña de cloprostenol podría simular la respuesta a un pulso natural de la PGF $2\alpha$ , mientras que una dosis mayor podría tener efectos equivalentes a los de varios pulsos frecuentes de la hormona. Es posible entonces que la administración de una dosis pequeña de PGF $2\alpha$  natural o de cloprostenol tenga un efecto inicial sobre las células lúteas similar al producido por dosis mayores, pero que en momentos posteriores los efectos sean dependientes de la dosis aplicada, lo que permitiría la recuperación de la función lútea cuando la dosis administrada no sea suficiente para llevar al individuo a un proceso de luteolisis irreversible. El periodo crítico en el que se define la irreversibilidad de la luteolisis debe localizarse en algún momento durante las 24 horas posteriores a la primera exposición del cuerpo lúteo, ya que para ese momento existe una diferencia significativa en las concentraciones de progesterona de las ovejas que completarán o no la luteolisis en respuesta a dosis reducidas de cloprostenol (Granados-Villarreal *et al.* 2017). Sin embargo, para delimitar con mayor precisión el momento en el que se produce esta definición es necesario realizar una determinación más frecuente de las concentraciones

de progesterona que la realizada por Granados-Villarreal *et al.* (2017). El objetivo de esta investigación fue comparar la respuesta inicial del cuerpo lúteo (concentraciones de progesterona) de la oveja después de la administración de dosis diferentes de cloprostenol, así como identificar el período crítico a partir del cual se produce una diferencia en los perfiles de progesterona entre los grupos tratados con diferentes dosis o entre los animales que completan o no la luteolisis después de la administración de una dosis reducida.

### **Materiales y Métodos**

El estudio se realizó con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación de la FMVZ-UNAM. Se utilizaron 28 ovejas adultas (4-7 partos) que se encontraban ciclando normalmente. Antes del inicio del experimento fueron sincronizadas con 125 µg de cloprostenol y se detectaron calores dos veces al día con la ayuda de un macho entero provisto de un mandil para evitar la cópula. El momento en el que se detectó el estro se consideró el día 0 del ciclo estral y al llegar al día 9 del ciclo (fase lútea media) los animales recibieron uno de tres tratamientos. Los animales del grupo 250 µg (n=8) fueron inyectados con 250 µg/oveja de cloprostenol, que corresponde al doble de una dosis comercial ya que se buscó garantizar una luteólisis efectiva y completa en todas las ovejas con el objeto de tomar a este grupo como un control positivo. El segundo grupo (Grupo 10 µg; n=15) fue tratado con 10 µg de cloprostenol por oveja, considerando que esta sería una dosis subluteolítica de acuerdo con lo encontrado por Granados-Villarreal *et al.* (2017). En el tercer grupo (testigo, n=5), las ovejas fueron inyectadas con un mililitro de solución salina. Aunque la asignación de los animales a los grupos fue aleatoria, se asignaron más animales al grupo en el que se esperaba mayor variabilidad en la respuesta (grupo 10 µg), un menor número al grupo en el que se esperaba una respuesta completa y homogénea (grupo 250 µg), y el menor número de animales al grupo testigo, en el que no se esperaba cambio en las concentraciones de progesterona.

Se caracterizó la respuesta del cuerpo lúteo a la administración de diferentes dosis de cloprostenol con el objeto de identificar el período crítico para la luteolisis. Éste último fue definido como el momento a partir del cual se detecta una divergencia en los perfiles de progesterona entre los tratamientos y entre los animales que completaron o no la luteolisis en respuesta a una dosis reducida de cloprostenol. Para ello, se obtuvieron muestras de sangre yugular para la determinación de progesterona antes del tratamiento (tiempo 0), cada dos horas durante las siguientes 24 horas, y posteriormente a las 36, 48 y 72 horas. Las muestras se recolectaron en tubos heparinizados y se centrifugaron para la separación del plasma. El plasma se mantuvo a -20°C hasta su análisis por

radioinmunoensayo, que se realizó utilizando un estuche comercial (Coat-A-Count P4; Siemens Medical Solutions, Los Angeles, CA). La sensibilidad del ensayo fue de 0.02 ng/ml, y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron 7.28 y 4.89 % respectivamente. Este método empleado ha sido validado para la oveja (Padmanabhan *et al.* 1995). Se consideró que la luteolisis se completó en una oveja cuando las concentraciones circulantes de progesterona se redujeron a menos de 1 ng/ml y permanecieron por debajo de ese nivel hasta el último muestreo.

### **Análisis estadístico**

Las concentraciones de progesterona en los diferentes momentos se compararon entre grupos mediante un análisis de varianza para mediciones repetidas, utilizando como variables independientes el grupo y el tiempo, con el efecto del animal anidado dentro del grupo.

### **Resultados**

Como se observa en el cuadro 1, en las ovejas del grupo 250 µg las concentraciones de progesterona comenzaron a disminuir inmediatamente después del tratamiento y a las 4 horas post tratamiento ya eran menores que las concentraciones iniciales para el mismo grupo ( $P < 0.05$ ). Posteriormente las concentraciones continuaron bajando y fueron significativamente menores ( $p < 0.05$ ) que las del grupo testigo desde las 12 horas post-tratamiento hasta que se completó el el muestreo a las 72 horas.

Las concentraciones de progesterona también comenzaron a disminuir inmediatamente después de la inyección en el grupo tratado con 10 µg de cloprostenol (cuadro 1), pero no difirieron de los niveles iniciales para el mismo grupo sino hasta las 12 horas post-tratamiento ( $p < 0.05$ ). Además, a partir de ese momento las concentraciones dejaron de disminuir y comenzaron a recuperarse, de forma que a las 24 horas post-tratamiento las concentraciones ya no eran distintas a las iniciales para el grupo ( $p > 0.05$ ). Como resultado de esta caída temporal, las concentraciones en el grupo 10 µg fueron significativamente menores a las del grupo testigo entre las 10 y las 22 horas post-tratamiento ( $p < 0.05$ ), pero fueron similares a las del grupo testigo a partir de las 24 h post tratamiento. Por otro lado, las concentraciones de progesterona en el grupo 10 µg fueron mayores que las del grupo 250 µg entre las 36 y las 72 horas post-tratamiento ( $P < 0.05$ ).



**Cuadro 1.** Concentraciones de progesterona en diferentes momentos después de la administración de 10 µg o 250 µg de cloprostenol.

Tiempo (h)	Progesterona (ng/ml)		
	Testigo	Grupo 10 µg	Grupo 250 µg
0	3.2 ± 0.7 <sup>a</sup>	3.9 ± 0.4 <sup>ab</sup>	5.9 ± 0.5 <sup>b</sup>
2	4.5 ± 0.7 <sup>a</sup>	3.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	5.2 ± 0.5 <sup>a</sup>
4	4.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.5 <sup>a*</sup>
6	5.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.4 <sup>b</sup>	2.6 ± 0.5 <sup>b*</sup>
8	4.1 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.5 <sup>a*</sup>
10	4.7 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.4 <sup>b</sup>	2.6 ± 0.5 <sup>ab*</sup>
12	4.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	1.8 ± 0.4 <sup>b*</sup>	1.5 ± 0.5 <sup>b*</sup>
14	3.1 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.4 <sup>ab*</sup>	1.0 ± 0.5 <sup>b*</sup>
16	4.3 ± 0.7 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.4 <sup>b*</sup>	0.8 ± 0.5 <sup>b*</sup>
18	4.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.4 <sup>ab</sup>	0.8 ± 0.5 <sup>b*</sup>
20	4.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.4 <sup>b*</sup>	0.9 ± 0.5 <sup>b*</sup>
22	5.2 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.4 <sup>b*</sup>	0.7 ± 0.5 <sup>b*</sup>
24	4.6 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.4 <sup>ab</sup>	0.5 ± 0.5 <sup>b*</sup>
36	4.1 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.5 <sup>b*</sup>
48	4.1 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.5 <sup>b*</sup>
72	4.7 ± 0.7 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.5 <sup>b*</sup>

<sup>a,b</sup> Para un determinado periodo (renglón), valores que no comparten por lo menos una literal son significativamente diferentes (p<0.05).

\*Los valores indicados con un asterisco son diferentes del valor inicial (hora 0) para el grupo (P<0.005).

La mayoría (11/15) de las ovejas del grupo tratado con 10 µg de cloprostenol no sufrieron luteolisis completa y solamente experimentaron una reducción transitoria en las concentraciones de progesterona. En la figura 1 se muestra que en esas ovejas las concentraciones de progesterona fueron menores a sus concentraciones iniciales solamente entre las 12 y las 16 horas post-tratamiento (P<0.05).

En contraste, en las 4 ovejas que si experimentaron luteólisis completa en este grupo, las concentraciones de progesterona fueron menores, a partir de las 10 horas post-tratamiento y hasta el

final del estudio, al compararlas con las obtenidas en el muestreo inicial (tiempo 0) ( $P < 0.05$ ). Del mismo modo, las concentraciones de progesterona de las ovejas tratadas con 10 de cloprostenol que sufrieron luteólisis completa, fueron menores a partir de las 24 horas post-tratamiento, que las de las ovejas del mismo grupo que sólo sufrieron una reducción transitoria en los niveles circulantes de esta hormona ( $P < 0.05$ ). Por otro lado, la luteólisis se completó 24 horas después de la administración del cloprostenol en las ovejas tratadas con 10  $\mu\text{g}$  que si sufrieron luteólisis, periodo mayor que las 16 horas requeridas para concluir este mismo proceso en las ovejas tratadas con 250  $\mu\text{g}$  del análogo.

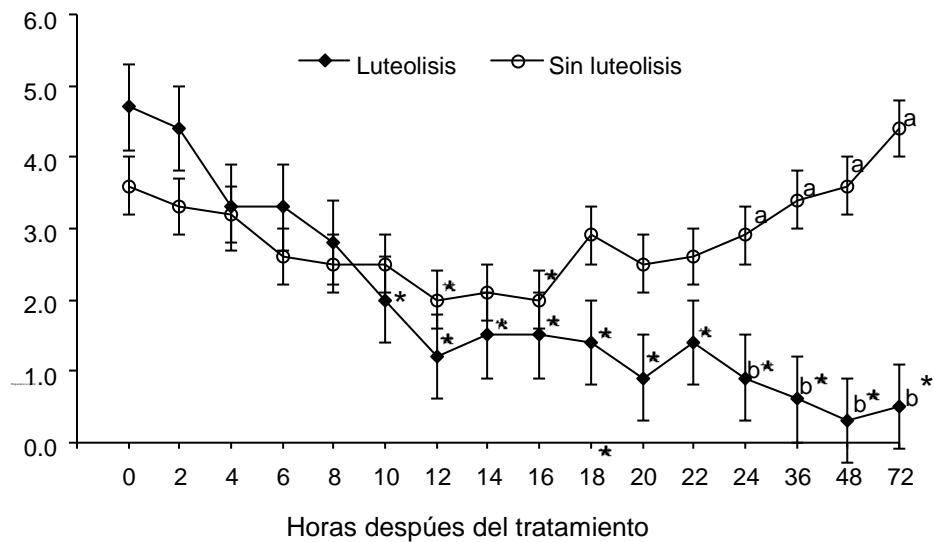


Figura 1. Concentraciones de progesterona en ovejas que experimentaron o no luteolisis completa después de la administración de una dosis reducida de 10  $\mu\text{g}$  de cloprostenol. \*Dentro de cada grupo, los periodos en los que las concentraciones de progesterona fueron significativamente menores ( $p < 0.05$ ) a los niveles iniciales se indican con un asterisco ( $P < 0.05$ ). <sup>a,b</sup> Para un determinado periodo, valores con distinta literal indican diferencias significativas entre los dos grupos ( $P < 0.05$ ).

## Discusión

En el presente trabajo la respuesta inicial del cuerpo lúteo fue similar en los dos grupos tratados con cloprostenol durante las primeras 12 horas post-tratamiento, a pesar de las grandes diferencias en las dosis de cloprostenol administradas (250 o 10  $\mu\text{g}$ ), lo que se apreció por una caída en las concentraciones de progesterona durante este periodo inicial. Debido a que durante la luteólisis natural se requiere de la generación de más de un pulso de  $\text{PGF}2\alpha$ , y que el intervalo entre pulsos de

la PGF2 $\alpha$  antes del inicio de la luteólisis es de 15.9 h, es posible que durante el período de tiempo de la luteólisis funcional (12 horas) se decida si las acciones luteoprotectivas de la progesterona podrán evitar el incremento en la frecuencia a un pulso cada 7.7 h, los que se asocia con la luteólisis (Zarco *et al.* 1988a).

En esta investigación, la respuesta lútea comenzó a diferir entre los grupos después de las 12 horas. Las concentraciones de progesterona se recuperaron gradualmente a partir de las 14 horas en el grupo tratado con 10  $\mu$ g, mientras que en el grupo tratado con 250  $\mu$ g continuaron descendiendo hasta alcanzar niveles basales (cuadro 1). Fierro *et al.* (2011) mencionó una asociación positiva entre las dosis administradas y la proporción de ovejas que detectadas en estro. Granados-Villarreal *et al.* (2017) también encontraron una recuperación en las concentraciones de progesterona entre las 12 y las 24 h post-tratamiento en ovejas tratadas con dosis reducidas de cloprostenol. Sin embargo, al haber muestreado cada 12 horas, no observaron la dinámica de las concentraciones de progesterona en periodos más frecuentes. En el presente trabajo el esquema de muestreo permitió determinar que la recuperación del cuerpo lúteo comenzó entre las 14 y las 18 horas post-tratamiento en el grupo tratado con dosis reducida (Cuadro 1). Además, dentro de ese grupo el comportamiento de los perfiles de progesterona comenzó a diferir a partir de las 18 horas entre los animales que completaron la luteolisis y aquellos que solo sufrieron una disminución transitoria en las concentraciones de progesterona dentro de ese mismo grupo (Figura 1).

Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Juengel *et al.* (2000) quienes encontraron que la administración de diferentes dosis de la PGF2 $\alpha$  natural resultaba en una disminución en las concentraciones de progesterona en todos los grupos durante las primeras 9 horas después de la inyección y que, en los grupos tratados con dosis reducidas, las concentraciones de progesterona se recuperaban entre las 12 y las 18 horas posteriores al tratamiento. Estos autores encontraron además que la administración de la dosis más reducida de la PGF2 $\alpha$  (3 mg/animal) resultó inicialmente (a las 9 h) en reducciones en las concentraciones de ARNm para StAR, similares a las que ocurrieron en grupos tratados con dosis mayores (10 o 30 mg). En el grupo tratado con dosis de 3 mg nunca se produjeron, sin embargo, las reducciones en las concentraciones de ARNm para el citocromo P450 $\text{scc}$ , para 3 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa o para los receptores para la LH que ocurrieron en los otros grupos. Adicionalmente, las concentraciones de ARNm para StAR se habían recuperado en el grupo tratado con 3 mg para las 24 h post-tratamiento. Todo esto sugiere que, aunque las dosis reducidas de la PGF2 $\alpha$  natural (Juengel *et al.* 2000) o sintética (Granados-Villarreal *et al.* 2017) resultan inicialmente en una caída en las concentraciones de progesterona, este descenso se debe casi

exclusivamente a una disminución transitoria en la expresión de StAR, y que dichas dosis no llegan a impactar significativamente en la producción de enzimas esteroidogénicas o de receptores para LH. Por el contrario, la continuación de la caída en las concentraciones de progesterona que se produce después de las 18 horas en respuesta a una dosis elevada de la PGF2 $\alpha$  sí puede estar relacionada con la reducción en las concentraciones de enzimas esteroidogénicas (P450scc y 3- $\beta$ HSD). De hecho, se ha observado una disminución en las concentraciones de estas enzimas en el cuerpo lúteo bovino entre las 12 y las 24 h post-tratamiento (Rodgers *et al.* 1995), a pesar de que el ARNm puede detectarse desde las 4 h postratamiento (Tsai *et al.* 2001). Esto indicaría que una dosis reducida de cloprostenol podría activar un mecanismo de señalización que resulte solo en la inhibición de StAR, sin que la producción de P450scc o 3- $\beta$ HSD se viera afectada, con la consecuencia de que no se produciría una reducción definitiva de las concentraciones de progesterona. En contraste, las dosis mayores de PGF2 $\alpha$  o de sus análogos podrían activar mecanismos de señalización adicionales que resulten en la inhibición de la producción de enzimas esteroidogénicas hasta resultar en la cesación completa de la actividad lútea.

Por otra parte, Juengel *et al.* (2000) encontraron que aún la dosis más reducida de la PGF2 $\alpha$  natural resultó en la presencia de oligonucleosomas en las células lúteas a las 9 horas post-inyección en la mayoría de las ovejas. Sin embargo, para las 24 h posteriores al tratamiento, solo el 20 % de las ovejas tratadas con dicha dosis continuaban mostrando oligonucleosomas. Dado que los oligonucleosomas son marcadores de apoptosis, es probable que las ovejas que mantenían oligonucleosomas 24 h después de un tratamiento con dosis reducida pudiera resultar en la regresión completa del cuerpo lúteo. Debe destacarse que el 20 % de ovejas que mantenían oligonucleosomas a las 24 h después del tratamiento con 3 mg de la PGF2 $\alpha$  natural (Juengel *et al.* 2000) es similar al 27% de ovejas que completaron luteolisis en el presente trabajo después del tratamiento con tan solo 10  $\mu$ g de cloprostenol.

La rápida inhibición de la producción de ARNm para las enzimas esteroidogénicas que se produce después del tratamiento con una dosis luteolítica efectiva de la PGF2 $\alpha$  (Tsai *et al.* 2001) y que resulta en la disminución efectiva en las concentraciones de dichas enzimas en el cuerpo lúteo entre las 12 y las 24 horas post-inyección (Rodgers *et al.* 1995; Atli *et al.* 2012) podría ser responsable de la continua presencia de oligonucleosomas 24 horas después del tratamiento (Juengel *et al.* 2000). La coincidencia temporal entre estos cambios y el periodo en el cual las concentraciones de progesterona se recuperaron en el presente trabajo, en las ovejas tratadas con dosis reducida que no sufrieron luteolisis, podría indicar que en dichas ovejas no llega a inhibirse la expresión de enzimas

esteroidogénicas. La disminución transitoria en las concentraciones de progesterona podría deberse a la inhibición transitoria de la producción de StAR. Este concepto es apoyado por los resultados de Atli *et al.* (2012) quienes encontraron que en vacas expuestas a cuatro pulsos pequeños de la PGF2 $\alpha$  se produjo una inhibición de la expresión de mRNA para P450scc después del cuarto pulso, el cual fue administrado 18 horas después de iniciado el tratamiento, mientras que en animales que recibieron solo dos pulsos en el mismo periodo de tiempo la inhibición de la expresión de P450scc ocurrió solo en las ovejas en las que se completó la luteolisis, y no en aquellas con inhibición transitoria de las concentraciones de progesterona.

Granados-Villarreal *et al.* (2017) sugirieron que los efectos de una dosis muy reducida de la PGF2 $\alpha$  podrían ser similares a los que se producen cuando un animal es expuesto a un insuficiente número de pulsos endógenos de la hormona (McCracken *et al.* 2012) , y que los animales que responden con luteolisis completa a esta dosis reducida posiblemente lo logren tras la activación de un mecanismo de auto-amplificación que involucra la producción endógena de la PGF2 $\alpha$  iniciada por la administración de la dosis reducida de cloprostenol.

El papel de este mecanismo de auto-amplificación es apoyado por los resultados del presente trabajo, ya que en los animales tratados con 250  $\mu$ g de cloprostenol (los cuales no requerirían de este mecanismo) las concentraciones de progesterona se mantuvieron por debajo de 1 ng/ml a partir de transcurridas 16 h después de la administración del tratamiento, mientras que en el grupo tratado con 10  $\mu$ g las concentraciones de progesterona en los animales que llegaron a completar la luteolisis solo bajaron de 1 ng/ml a partir de las 24 h post tratamiento. Este retraso de 8 horas sugiere que estos animales pudieron requerir de la secreción endógena de la PGF2 $\alpha$  para provocar los cambios requeridos para la regresión final del cuerpo lúteo (como inhibición de P450scc).

Por otro lado, la concentración más baja de progesterona en los animales a los que se les inyectaron 10  $\mu$ g/ml ocurrió a las 12 horas después del tratamiento, pero las concentraciones de progesterona se recuperaron entre las 14 y 18 horas post-tratamiento. Cabe señalar que la progesterona nunca bajó a concentraciones menores de 1 ng/ml. En los animales a los que se les administró 250  $\mu$ g/ml se observó una caída en las concentraciones de progesterona a menos de 1 ng/ml a partir de las 16 horas (cuadro 1), que fue una caída definitiva ya que las ovejas completaron la luteólisis. Esto podría sugerir la existencia de un período crítico, en el cual, las concentraciones de progesterona pueden recuperarse. El período crítico (12 y 16 h post-tratamiento) observado en este estudio corresponde con el tiempo requerido para que se inicie la luteólisis estructural (> 12 horas, Schams y Berisha, 2004), lo cual

hace suponer que, para este momento, las concentraciones de progesterona no pudieron contrarrestar el proceso de apoptosis inducido por la PGF2 $\alpha$ , por lo que se dará inicio a la luteólisis estructural.

### **Conclusiones**

Se concluye que la respuesta inicial del cuerpo lúteo dentro de las primeras 12 horas post-tratamiento es semejante con cualquiera de las dosis de cloprostenol administradas (250 y 10  $\mu$ g), sin embargo, entre las 12 y las 18 horas después de la administración de cloprostenol, existe un período crítico en el cual posiblemente se determina si la luteólisis se completará o no en respuesta a un tratamiento con dosis reducida.

**Agradecimientos:** Financiado por el proyecto PAPIIT IN213915 de DGAPA-UNAM. Luz María Granados fue financiada en sus estudios doctorales por CONACYT.

### **Referencias**

- Atli, M.O., Bender, R.W., Mehta, V., Bastos, M.R., Luo, W., Vezina, C.M., Wiltbank, M.C., 2012. Patterns of gene expression in the bovine corpus luteum following repeated intrauterine infusions of low doses of prostaglandin F2 $\alpha$ . *Biol. Reprod.* 86,130, 1-13
- Diaz, F. J., Luo, W., Wiltbank, M. C. 2013. Prostaglandin F2 $\alpha$  regulation of mRNA for activating protein 1 transcriptional factors in porcine corpora lutea (CL): Lack of induction of JUN and JUND in CL without luteolytic capacity. *Domest. Anim. Endocrinol.* 44, 98-108.
- Fierro, S., Viñoles, C., Olivera-Muzante, J. 2017. Long term prostaglandin based-protocols improve the reproductive performance after timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, 90, 109-113.
- Granados-Villarreal, L.M., Zarco, L., Mejía O., Sánchez-Torres, M.T., Pablos-Hach, J. L. 2017. Effect of stage of the luteal phase and progesterone concentrations at the time of injection on the luteolytic efficiency of cloprostenol in the ewe. *Anim. Reprod. Sci.* 186, 68-76.
- Juengel, J. L., Haworth, J. D., Rollyson, M. K., Silva, P. J., Sawyer, H. R., Niswender, G. D. 2000. Effect of dose of prostaglandin F2 $\alpha$  on steroidogenic components and oligonucleosomes in ovine luteal tissue. *Biol. Reprod.* 62, 1047-1051.
- Lee, J., McCracken, JA., Stanley, JA., Nithy, T.K., Banu, S.K., Arosh J.A. 2012. Intraluteal prostaglandin biosynthesis and signaling are selectively directed towards PGF2 $\alpha$  during

luteolysis but towards PGE<sub>2</sub> during the establishment of pregnancy in sheep. *Biol. Reprod.* 87(4):97, 1-4.

Liu, T. C., Ho, C. Y., Chan, J. P. W. 2017. Effect of two low doses of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  on luteolysis in dairy cows. *Acta Vet. Hungarica*, 65, 105-114.

McCracken, J. A., Custer, E. E., Schreiber, D. T., Tsang, P. C. W., Keator, C. S., Arosh, J. A. 2012. A new in vivo model for luteolysis using systemic pulsatile infusions of PGF 2 $\alpha$ . *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 97, 90-96.

Padmanabhan, V., Evans, N. P., Dahl, G. E., McFadden, K. L., Mauger, D. T., Karsch, F. J. 1995. Evidence for short or ultrashort loop negative feedback of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Neuroendocrinology*, 62, 248-258.

Répassi, A., Beckers, J. F., Sulon, J., Karen, A., Reiczigel, J., Szenci, O. 2005. Effect of the type and number of prostaglandin treatments on corpus luteum, the largest follicle and progesterone concentration in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 40, 436-442.

Rodgers, R. J., Vella, C. A., Young, F. M., Tian, X. C., Fortune, J. E. 1995. Concentrations of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme and 3 beta-hydroxysteroid deshydrogenase during prostaglandin F<sub>2</sub> alpha-induced luteal regression in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 1213-1216.

Talbott, H., Hou, X., Qiu, F., Zhang, P., Guda, C., Yu, F., Cushman, R.A., Wood, J.R., Wang, C., Cupp, A.S., Davis, J.S. 2017. Early transcriptome responses of the bovine midcycle corpus luteum to prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  includes cytokine signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 452:93-109.

Tsai SJ, Wiltbank MC. 1997. Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  induces expression of prostaglandin G/H synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. *Biol. Reprod.* 57, 1016-1022.

Thorburn, G.D., Nicol, D.H., 1971. Regression of the ovine corpus luteum after infusion of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  into the ovarian artery and uterine vein. *J. Endocrinol.* 51, 785-786.

Tsai, S.J., Kot, K., Ginther, O.J., Wiltbank, M.C. 2001. Temporal gene expression in bovine corpora lutea after treatment with PGF<sub>2</sub>alpha based on serial biopsies in vivo. *Reproduction*, 121, 905-913.

Zarco, L., Stabenfeldt, G. H., Quirke, J. F., Kindahl, H., Bradford, G. E. 1988. Release of prostaglandin F-2 $\alpha$  and the timing of events associated with luteolysis in ewes with oestrous cycles of different lengths. *J. Reprod. Fertil.* 83, 517-526.



## **CAPITULO 5**

### **DISCUSIÓN GENERAL**

Los resultados de esta tesis indican que la sensibilidad del cuerpo lúteo al tratamiento con dosis reducidas de cloprostenol depende de las concentraciones iniciales de progesterona.

El primer estudio (capítulo 2, “Respuesta estral a diferentes dosis de cloprostenol en distintas etapas de la fase lútea en ovejas suffolk: Estudio piloto”), mostró que las distintas dosis de cloprostenol utilizadas en dicho experimento fueron luteolíticas independientemente del momento de la administración (fase lútea temprana, media o tardía). Sin embargo, la eficiencia luteolítica (en términos del porcentaje total de animales en los que se observó una luteólisis completa después del tratamiento), se mejora conforme se incrementa la dosis. Esto concuerda con Stacy *et al.* (1976), quienes mencionan que la variabilidad en la respuesta del cuerpo lúteo puede deberse a la magnitud de la dosis administrada. Igualmente, Fukui y Roberts, (1981) utilizando dosis decrecientes de PGF2 $\alpha$  (8, 16 o 24 mg), encontraron una mayor proporción de ovejas mostrando comportamiento estral con la administración de las dosis más altas. El hecho de que, en el estudio piloto de esta tesis no se observaran diferencias en la respuesta luteolítica en relación a la dosis, ni tampoco al momento en el que el cloprostenol fue administrado, dificultó detectar diferencias intrínsecas en la sensibilidad del cuerpo lúteo. Sin embargo, el que una determinada proporción de los animales en todos los grupos no haya respondido al tratamiento, indica variaciones individuales. En ese sentido, Herrera *et al.* (1990) y Hernández-Cerón *et al.* (2001) observaron que los animales que no mostraron celo después de la aplicación de PGF2 $\alpha$ , eran los que presentaron mayores concentraciones de progesterona al inicio del tratamiento, indicando que los niveles de este esteroide pudieran influenciar la eficiencia luteolítica.

Por lo anterior, en el segundo experimento (capítulo 3 “La eficiencia luteolítica de dosis reducidas de cloprostenol en la oveja. Efecto de las concentraciones de progesterona al momento del tratamiento”) se evaluaron las concentraciones de progesterona antes y después del tratamiento luteolítico con el fin de determinar si en efecto las diferencias individuales impactaban en la variabilidad de la respuesta. Además, se incluyeron dosis menores de cloprostenol, para identificar aquella en la que la proporción de animales que respondían y no respondían al tratamiento fuera similar, para encontrar un modelo que permitiera identificar las diferencias intrínsecas del cuerpo lúteo en respuesta a este tratamiento luteolítico.

En general, los hallazgos obtenidos en dicho experimento mostraron 3 posibles respuestas del cuerpo lúteo después de la administración de dosis reducidas de cloprostenol (7.5, 12.5, 25 y 50  $\mu\text{g}$ ) de cloprostenol: una mínima respuesta, una disminución transitoria de las concentraciones de progesterona, o la ocurrencia de luteólisis completa. La mínima respuesta se relacionó a las dosis menores de cloprostenol utilizadas (7.5 y 12.5  $\mu\text{g}$ ) y no se observaron alteraciones en las concentraciones de progesterona sistémicas después del tratamiento. Conforme se incrementó la dosis de cloprostenol a 25  $\mu\text{g}$ , se observó una disminución en las concentraciones de la progesterona circulante, pero fue transitoria, lo cual indica que la luteólisis se inició, pero no se completó en estos animales. Una disminución transitoria de progesterona se ha observado previamente al utilizar un tratamiento con dosis reducidas de cloprostenol en vaquillas (Colazo *et al.*, 2002) y en vacas (Trevisol *et al.* 2015). Dichos autores sugieren que la diferencia en la sensibilidad lútea podría explicar la variación en la respuesta del cuerpo lúteo a dosis reducidas de cloprostenol. Tal disminución podría ser resultado de una posible interrupción de la entrega de colesterol a la mitocondria (Trevisol *et al.* 2015), con lo cual se vería afectada la esteroidogénesis, y con ello, las concentraciones de progesterona. En efecto, Juengel *et al.* (2000) menciona una disminución del ARNm para StAR en tejido lúteo a partir de las 9 horas después de la inyección de dosis reducidas de PGF $2\alpha$ .

Una distinción importante entre las ovejas que sufrieron luteólisis transitoria y los animales en los que se completó el proceso luteolítico, fue que, además de la reducción antes mencionada de la enzima StAR, se observa también una disminución en las enzimas esteroidogénicas 3 $\beta$ -HSD y P450 $scc$ , a partir de las 24 h posteriores al tratamiento (Rodgers *et al.* 1995). Sin embargo, esto último no necesariamente se refleja de manera inmediata en un descenso abrupto en las concentraciones de progesterona, ya que la vida media de las enzimas esteroidogénica es larga (Purvis *et al.* 1973, Boggaram *et al.* 1984). Entonces, por un lado, es posible que el cuerpo lúteo puede recuperarse antes de que se complete la luteólisis funcional (12 horas). Por otro lado, si hay elevadas concentraciones de progesterona, las acciones de protección al cuerpo lúteo podrían ser más efectivas, en términos de contrarrestar los efectos de dosis bajas de la PGF $2\alpha$  o sus análogos sobre la esteroidogénesis. Además de los efectos de la PGF $2\alpha$  sobre las enzimas esteroidogénicas, también se observa una acción directa de esta hormona en la modulación a la baja o al alta de factores angiogénicos y vasoconstrictores (VEGFA, Berisha *et al.* 2010; ET-1, eNOS, Shirasuna *et al.* 2010b), que puede ocurrir en los minutos siguientes a la administración del agente luteolítico.

Anteriormente se mencionó la capacidad luteoprotectora atribuida a las altas concentraciones de progesterona. Este efecto de protección no parece estar relacionado con la modulación de las enzimas relativas a la síntesis de progesterona o de los factores involucrados en la formación o en la función

de los vasos sanguíneos, sino que parece llevarse a cabo por una vía indirecta. No obstante, es claro que las acciones de protección al cuerpo lúteo deben ser rápidas para contrarrestar el proceso luteolítico de manera eficiente. Al ser un esteroide, la progesterona actúa clásicamente utilizando receptores nucleares y modificando la expresión genética, lo cual resulta en un proceso lento (horas). Sin embargo, es posible que la progesterona pueda ejercer sus acciones luteoprotectivas por la vía no transcripcional, ya que es una ruta mucho más rápida (segundos o minutos) (Bishop y Stormshak, 2008). En efecto, se ha visto que la progesterona a través de la vía no genómica puede disminuir rápidamente la afinidad de la oxitocina por su receptor en las células de tejido endometrial (Bishop, 2013), debido a un cambio en la conformación del mismo (Dunlap y Stormshak, 2004), e inhibir la capacidad de la oxitocina de liberar  $\text{Ca}^{2+}$  en las células lúteas pequeñas del ovino (Davis *et al.* 2010). Además, puede inhibir el incremento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células lúteas grandes inducido por  $\text{PGF2}\alpha$  (Davis *et al.* 2010). Estas acciones de la progesterona son importantes ya que por un lado la luteólisis se induce a través de rutas mediadas por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Olivera *et al.* 2007) y por el otro, el bloquear el mecanismo de acción de la oxitocina impide la generación de los pulsos de  $\text{PGF2}\alpha$  endógena necesarios para que se complete la luteólisis.

Se sabe que la  $\text{PGF2}\alpha$  exógena puede estimular la liberación de la  $\text{PGF2}\alpha$  endógena tanto del útero como del ovario (Wade y Lewis, 1996), en donde aún un pulso de baja magnitud puede iniciar la luteólisis (Tsai y Wiltbank, 1997). Sin embargo, para que la luteólisis se complete, se requiere de un total de 5 (McCracken *et al.* 2012) a 6 pulsos (Zarco *et al.* 1988b) que se desencadenan a través de un mecanismo local de autoamplificación, en el cual participa la oxitocina.

Además de la regresión funcional del cuerpo lúteo, que ocurre antes de los cambios morfológicos en la integridad de las células lúteas (Stocco *et al.* 2007), la progesterona debe también ser capaz de suprimir la apoptosis en las células lúteas, en aquellos casos en los que la luteólisis no se completa. Esto lo logra a través de la disminución de la producción del ARNm para Fas y caspasa-3, así como de la inhibición de la actividad de esta última (Okuda *et al.* 2004).

De los datos presentados anteriormente podría extraerse que la progesterona podría prevenir la luteólisis al bloquear el segundo pulso de la  $\text{PGF2}$  e impedir que se desencadene el mecanismo de autoamplificación necesario para que se complete la luteólisis; y que su efecto protector es más eficiente cuando sus concentraciones son altas. De hecho, es posible que las acciones luteoprotectivas de la progesterona contrarresten los efectos agudos de dosis pequeñas de cloprostenol. Por esta razón, la dosis de 25  $\mu\text{g}$  podría permitir una recuperación en las concentraciones de progesterona,

probablemente debido a ambos efectos combinados: la administración de dosis bajas de cloprostenol y las altas concentraciones de la progesterona al inicio del tratamiento.

Un hallazgo adicional importante del segundo experimento fue el identificar un descenso en las concentraciones de progesterona dentro de las primeras 12 h después de la administración del cloprostenol, independientemente de las dosis, de la respuesta final del cuerpo lúteo (con una mínima respuesta, disminución transitoria o con luteólisis), o de las concentraciones iniciales de progesterona. Lo que sugiere la existencia de un periodo crítico que marca la divergencia hacia la recuperación o hacia la luteólisis. Durante las primeras doce horas después del tratamiento con cloprostenol se observó una disminución semejante entre grupos en las concentraciones de progesterona. Con esta observación se debe tomar en cuenta que dicha disminución en las concentraciones de progesterona resulta también de la administración de dosis reducidas de la PGF2 $\alpha$  natural (Juengel *et al.* 2000), lo que podría indicar que dicho efecto es parte del mecanismo inicial de la luteólisis. Al observarse que después de las doce horas los niveles de progesterona se comportan de acuerdo con la dosis administrada (con una mínima respuesta, con una disminución transitoria o con luteólisis), se puede inferir la existencia de un período crítico, en el cual se define si el cuerpo lúteo completa o no la luteólisis. Sin embargo, se hacía necesario un intervalo de muestreo más frecuente que permitiera establecer con mayor detalle las características de dicho período crítico.

Por lo tanto, en el tercer experimento (capítulo 4, “Periodo crítico para completar la luteolisis después de la administración de una dosis reducida de cloprostenol en la oveja”) se obtuvieron muestras sanguíneas para la medición de progesterona antes de la aplicación del cloprostenol, cada dos horas durante las primeras 24 horas subsecuentes, y a las 36, 48 y 72 horas después del tratamiento. Este esquema de muestreo permitió caracterizar la respuesta inicial del cuerpo lúteo a la administración de diferentes dosis de cloprostenol (10 y 250  $\mu$ g, y un grupo testigo), así como el momento en el cual se define si un animal completará o no la luteólisis. Los resultados de la presente investigación pudieron corroborar que la respuesta inicial del cuerpo lúteo fue similar en los dos grupos tratados con cloprostenol durante las primeras 12 horas post-tratamiento, a pesar de las grandes diferencias en la dosis de cloprostenol administrada a las ovejas de cada grupo (10 y 250  $\mu$ g). Además, pudo establecerse que la respuesta lútea comenzó a diferir entre los grupos después de las 12 horas, ya que las concentraciones de progesterona se recuperaron gradualmente a partir de las 14 horas siguientes al tratamiento en el grupo con 10  $\mu$ g. Mientras que el grupo tratado con 250  $\mu$ g continuaron descendiendo hasta alcanzar niveles basales. Es importante destacar que las concentraciones de progesterona al inicio del tratamiento estuvieron más elevadas en las ovejas que recibieron una dosis de 250  $\mu$ g, lo que podría indicar que cuando la dosis de PGF2 $\alpha$  es alta, los efectos luteoprotectivos

de la progesterona no son suficientes para impedir la luteólisis. Probablemente se deba a que una dosis alta inducirá de manera más rápida y efectiva la frecuencia y el número de pulsos de la PGF2 $\alpha$ . De hecho, en la presente investigación, los efectos de la PGF2 $\alpha$  sobre las concentraciones de progesterona pudieron observarse más rápido en los animales que sufrieron luteólisis (250  $\mu$ g), que en los del grupo de 10  $\mu$ g. A las 16 horas siguientes al tratamiento, las concentraciones de progesterona tuvieron una máxima disminución en el grupo de 10  $\mu$ g (sin llegar a ser menor a 1 ng/mL). Lo anterior podría indicar que entre las 12 y las 16 horas existe un período crítico en el cual se decide el destino del cuerpo lúteo. El período crítico descrito en esta investigación se observa dentro del tiempo de la luteólisis estructural (>12 horas, Schams y Berisha, 2004). Sin embargo, después de las 18 h se reporta un aumento en la expresión de FasL (Yadav *et al.* 2005), lo que permite suponer que, para este momento, las concentraciones de progesterona no pudieron contrarrestar el proceso de apoptosis inducido por la PGF2 $\alpha$ , por lo que se dará inicio a la luteólisis estructural. Cuando se administra una dosis alta de cloprostenol, los efectos sobre la luteólisis funcional y estructural ocurren en forma más rápida. Por ello, a pesar de que los efectos no genómicos de la progesterona son rápidos, no lograron evitar la generación de pulsos continuos de la PGF2 $\alpha$  endógena. Entonces, de lo anterior se desprende que si se inyecta el cloprostenol cuando las concentraciones de progesterona están elevadas, lo más importante sería que la dosis inicial administrada sea lo suficientemente alta para contrarrestar los efectos protectores de las concentraciones circulantes iniciales de progesterona.

En base a los experimentos realizados y a la literatura consultada, se concluye que las altas concentraciones de progesterona al inicio del tratamiento con dosis reducidas de cloprostenol, están asociadas a una disminución en la sensibilidad del cuerpo lúteo. Es posible que las dosis reducidas de cloprostenol puedan iniciar el mecanismo de auto-amplificación, pero este no se completa debido a la presencia de las elevadas concentraciones de progesterona al inicio del tratamiento. Se concluye que la respuesta inicial del cuerpo lúteo (dentro de las primeras 12 horas) fue similar, independientemente de la dosis de cloprostenol utilizada, y que existe un período crítico entre las 12 y las 18 horas post tratamiento en el cual, se determina si la luteólisis se completa o no en respuesta a un tratamiento con dosis reducida.

## Referencias

- Abecia, J.A., Forcada, F. González-Bulnes, A. 2011. Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.* 27,67–79.
- Abecia J.A. Forcada F. González-Bulnes A. 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 130,173-179.
- Accialini, P., Hernández, S. F., Bas, D. Pazos, M. C., Irusta, G., Abramovich, D., Tesone, M. 2015. A link between Notch and progesterone maintains the functionality of the rat corpus luteum. *Reproduction* 149, 1-10.
- Acosta, T. J., Miyamoto, A., Ozawa, T., Wijayagunawardane, M. P., Sato, K. 1998. Local release of steroid hormones, prostaglandin E2, and endothelin-1 from bovine mature follicles in vitro: effects of luteinizing hormone, endothelin-1, and cytokines. *Biol. Reprod.* 59, 437-443.
- Acosta, T. J., Yoshizawa, N., Ohtani, M., Miyamoto, A. 2002. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F2 $\alpha$  injection in the cow. *Biol. Reprod.* 66, 651-658.
- Acosta, T. J., Hayashi, K. G., Ohtani, M., Miyamoto, A. 2003. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction* 125, 759-767.
- Acosta, T. J., Miyamoto, A., 2004. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim. Reprod. Sci.* 82, 127-140.
- Acosta, T. J., Hayashi, K.G., Matsui, M., Miyamoto, A. 2005. Changes in follicular vascularity during the first follicular wave in lactating cows. *J. Reprod. Dev.* 51, 273-280.
- Acritopoulou, S., Haresign, W. 1980. Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF-2 $\alpha$  given at different stages of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 58, 219-223.
- Akishita, M., Kozaki, K., Eto, M., Yoshizumi, M., Ishikawa, M., Toba, K., Orimo, H., Ouchi, Y. 1998. Estrogen attenuates endothelin-1 production by bovine endothelial cells via estrogen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 17-21.
- Amiridis, G.S., Cseh S. 2012. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 130,152– 161.
- Amselgruber, W. M., Schäfer, M., Sinowatz, F. 1999. Angiogenesis in the bovine corpus luteum: an immunocytochemical and ultrastructural study. *Anat. Histol. Embryol.* 28, 157-166.
- Anderson, L. E., Wu, Y. L., Tsai, S. J., Wiltbank, M. C. 2001. Prostaglandin F2 $\alpha$  receptor in the corpus luteum: recent information on the gene, messenger ribonucleic acid, and protein. *Biol. Reprod.* 64, 1041-1047.

- Arese, M., Chen, Y., Florkiewicz, R. Z., Gualandris, A., Shen, B., Rifkin, D. B. 1999. Nuclear activities of basic fibroblast growth factor: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals. *Mol. Biol. Cell*, 10, 1429-1444.
- Arosh, J. A., Parent, J., Chapdelaine, P., Sirois, J., Fortier, M. A. 2002. Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 67, 161-169.
- Arosh, J. A., Banu, S. K., Chapdelaine, P., Madore, E., Sirois, J., Fortier, M. A. 2004. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology*. 145, 2551-2560.
- Ashley, R. L., Clay, C. M., Farmerie, T. A., Niswender, G. D., Nett, T. M. 2006. Cloning and characterization of an ovine intracellular seven transmembrane receptor for progesterone that mediates calcium mobilization. *Endocrinology*, 147, 4151-4159.
- Atli, M.O., Bender, R.W., Mehta, V., Bastos, M.R., Luo, W., Vezina, C.M., Wiltbank, M.C. 2012. Patterns of gene expression in the bovine corpus luteum following repeated intrauterine infusions of low doses of prostaglandin F2alpha. *Biol. Reprod.* 86,130, 1-13
- Baby, T. E., Bartlewski, P. M. 2011. Circulating concentrations of ovarian steroids and follicle-stimulating hormone FSH in ewes with 3 or 4 waves of antral follicle emergence per estrous cycle. *Reprod. Biol.* 11, 19-36.
- Bah M.M., Acosta T.J., Pilawski W., Deptula K., Okuda K., Skarzynski DJ. 2006. Role of intraluteal prostaglandin F2alpha, progesterone and oxytocin in basal and pulsatile progesterone release from developing bovine corpus luteum. *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* 79,218-29.
- Baird, D. T. 1974. Prostaglandin F2 $\alpha$  and ovarian blood flow in sheep. *J. Endocrinol.* 62, 413-414.
- Baird, D.T., Scaramuzzi, R.J. 1975. Prostaglandin F2 $\alpha$  and luteal regression in the ewe: comparison with 16 aryloxyprostaglandin I. C. I. 80, 996. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 15,161-174.
- Banu, S. K. Arosh, J. A. Chapdelaine, P. Fortier, M. A. 2003. Molecular cloning and spatio-temporal expression of the prostaglandin transporter: a basis for the action of prostaglandins in the bovine reproductive system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 11747-11752.
- Banu, S. K., Lee, J., Satterfield, M. C., Spencer, T. E., Bazer, F. W., Arosh, J. A. 2008. Molecular cloning and characterization of prostaglandin PG transporter in ovine endometrium: role for multiple cell signaling pathways in transport of PGF2 $\alpha$ . *Endocrinology* 149, 219-231.

- Barrett, D. M. W., Bartlewski, P. M., Cook, S. J., Rawlings, N. C. 2002. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to PGF 2 $\alpha$  given at different stages of the luteal phase in ewes. *Theriogenology* 58, 1409-1424.
- Bartlewski, P. M., Beard, A. P., Cook, S. J., Chandolia, R. K., Honaramooz, A., Rawlings, N. C. 1999a. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J. Reprod. Fertil.* 115, 111-124.
- Bartlewski, P. M., Beard, A. P., Rawlings, N. C. 1999b. An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *Theriogenology*, 52, 115-130.
- Bartol, F. F., Thatcher, W. W., Bazer, F. W., Kimball, F. A., Chenault, J. R., Wilcox, C. J., Roberts, R. M. 1981. Effects of the estrous cycle and early pregnancy on bovine uterine, luteal, and follicular responses. *Biol. Reprod.* 25, 759-776.
- Bashour, N.M., Wray, S. 2012. Progesterone directly and rapidly inhibits GnRH neuronal activity via progesterone receptor membrane component 1. *Endocrinology*, 153, 4457-4469.
- Beard, A. P., Lamming, G. E. 1994. Oestradiol concentration and the development of the uterine oxytocin receptor and oxytocin-induced PGF2 $\alpha$  release in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 100, 469-475.
- Bergström, S., Danielsson, H., Klenberg, D. Samuelsson, B. 1964. The Enzymatic Conversion of Essential Fatty Acids into Prostaglandins. *Prostaglandins and Related Factors* 34. *J. Biol. Chem.* 239, PC4006-PC4008.
- Berisha, B., Schams, D. 2005. Ovarian function in ruminants. *Dom. Anim. Endocrinol.* 29, 305-317.
- Berisha, B., Welter, H., Shimizu, T., Miyamoto, A., Meyer, H. H., Schams, D. 2006. Expression of fibroblast growth factor 1 FGF1 and FGF7 in mature follicles during the periovulatory period after GnRH in the cow. *J. Reprod. Dev.* 52, 307-313.
- Berisha, B., Steffl, M., Welter, H., Kliem, H., Meyer, H. H., Schams, D., Amselgruber, W. 2008. Effect of the luteinising hormone surge on regulation of vascular endothelial growth factor and extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors in bovine follicles. *Reprod. Fertil. Dev.* 20, 258-268.
- Berisha, B., Meyer, H. H., Schams, D. 2010. Effect of prostaglandin F2 alpha on local luteotropic and angiogenic factors during induced functional luteolysis in the bovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 82, 940-947.
- Berisha, B., Schams, D., Rodler, D., Pfaffl, M. W. 2016. Angiogenesis in the ovary—the most important regulatory event for follicle and corpus luteum development and function in cow—An overview. *Anat Histol. Embryol.* 45, 124-130.



- Berisha, B., Schams, D., Rodler, D., Sinowatz, F., Pfaffl, M. W. 2017. Expression pattern of HIF1alpha and vasohibins during follicle maturation and corpus luteum function in the bovine ovary. *Reprod. Domest. Anim.* 52, 130-139.
- Bilsel, A. S., Moini, H., Tetik, E., Aksungar, F., Kaynak, B., & Özer, A. (2000). 17 $\beta$ -Estradiol modulates endothelin-1 expression and release in human endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 46,579-584.
- Bishop, C.V., Stormshak, F. 2006. Nongenomic action of progesterone inhibits oxytocin-induced phosphoinositide hydrolysis and prostaglandin F2 $\alpha$  secretion in the ovine endometrium. *Endocrinology* 147,937–942.
- Bishop, C.V., Stormshak, F. 2008. Non-genomic actions of progesterone and estrogens in regulating reproductive events in domestic animals. *Vet. J.* 176, 270–280.
- Bishop, C. V. 2013. Progesterone inhibition of oxytocin signaling in endometrium. *Front. Neurosci.* 7, 138.
- Bogacki, M., Silvia, W.J., Rekawiecki, R., Kotwica, J. 2002. Direct inhibitory effect of progesterone on oxytocin-induced secretion of prostaglandin F2 $\alpha$  from bovine endometrial tissue. *Biol. Reprod.* 67, 184–188.
- Boggaram, V. Zuber, M. X. Waterman, M. R. 1984. Turnover of newly synthesized cytochromes P-450 $\alpha$  and P-45011 $\beta$  and adrenodoxin in bovine adrenocortical cells in monolayer culture: Effect of adrenocorticotropin. *Arch. Biochem. Biophys.* 231, 518-523.
- Bos, C. L., Richel, D. J., Ritsema, T., Peppelenbosch, M. P., Versteeg, H. H. 2004. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1187-1205.
- Bowolaksono, A., Nishimura, R., Hojo, T., Sakumoto, R., Acosta, T. J., Okuda, K. 2008. Anti-apoptotic roles of prostaglandin E2 and F2alpha in bovine luteal steroidogenic cells. *Biol. Reprod.* 79, 310-317.
- Breyer, R.M., Bagdassarian, C.K., Myers, S.A., Breyer, M.D. 2001. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41:661-690.
- Burns, P. D., Graf, G. A., Hayes, S. H., Silvia, W. J. 1997. Cellular mechanisms by which oxytocin stimulates uterine PGF2 $\alpha$  synthesis in bovine endometrium: roles of phospholipases C and A2. *Domest. Anim. Endocrinol.* 14, 181-191.
- Burr, G. O., Burr, M. M. 1929. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *J. Biol. Chem.* 82, 345-367.
- Burr, G. O., Burr, M. M. 1930. On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition. *J. Biol. Chem.* 86, 587-621.

- Caraty, A. Skinner, D. C. 1999. Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology*, 140, 165-170.
- Cárdenas, H. Wiley, T. M. Pope, W. F. 2004. Prostaglandin F 2 $\alpha$ -induced estrus in ewes exhibiting estrous cycles of different duration. *Theriogenology*, 62, 123-129.
- Chabbert-Buffet, N., Skinner, D. C., Caraty, A., Bouchard, P. 2000. Neuroendocrine effects of progesterone. *Steroids*, 65, 613-620.
- Chen, D. B., Westfall, S. D., Fong, H. W., Roberson, M. S., Davis, J. S. 1998. Prostaglandin F2 $\alpha$  stimulates the Raf/MEK1/mitogen-activated protein kinase signaling cascade in bovine luteal cells. *Endocrinology*, 139, 3876-3885.
- Chowdhury, M. W. H., Scaramuzzi, R. J., Wheeler-Jones, C. P. D., Khalid, M. 2010. The expression of angiogenic growth factors and their receptors in ovarian follicles throughout the estrous cycle in the ewe. *Theriogenology* 73, 856-872.
- Chulada, P. C., Loftin, C. D., Winn, V. D., Young, D. A., Tiano, H. F., Eling, T. E., Langenbach, R. 1996. Relative activities of retrovirally expressed murine prostaglandin synthase-1 and-2 depend on source of arachidonic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 330, 301-313.
- Clasadonte, J., Sharif, A., Baroncini, M., Prevot, V. 2011. Gliotransmission by prostaglandin E2: a prerequisite for GnRH neuronal function? *Front Endocrinol.* 2,1-12.
- Cohen, G. M. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1-16.
- Conley, A.J.1., Kaminski, M.A, Dubowsky, S.A, Jablonka-Shariff, A, Redmer, D.A, Reynolds, L.P. 1995. Immunohistochemical localization of 3 beta-hydroxysteroid deshydrogenase and P450 17 alpha-hydroxylase during follicular and luteal development in pigs, sheep, and cows. *Biol Reprod.* 52:1081-94.
- Conley A.J., Bird I.M. 1997. The role of cytochrome P45017 $\alpha$ -hidroxilasa y 3 $\beta$ -hidrosteroid dehydrogenase in the integration oof gonadal and adrenal steroidogenesis via the  $\Delta$ 5 and  $\Delta$ 4 pathways of steriogenesis in mammals *Biol. Reprod.* 56: 789-799.
- Contreras-Solís, I., Vasquez, B., Diaz, T., Letelier, C., Lopez-Sebastian, A., González-Bulnes, A. 2009a. Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and “male effect”. *Theriogenology* 71, 1018–1025.
- Contreras-Solís, I., Vasquez, B., Diaz, T., Letelier, C., Lopez-Sebastian, A., González-Bulnes, A. 2009b. Ovarian and endocrine responses in tropical sheep treated with reduced doses of cloprostenol. *Anim. Reprod. Sci.* 114,384-392.

- Corteel, M. 1975. Luteolysis induced by prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  compared with natural luteolysis in the ewe. an ultrastructural study. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 15, 175-180.
- Custer, E.E., Lamsa, J.C., Eldering, J.A., McCracken, J.A. 1995. Identification of functional high and low affinity states of the prostaglandin F<sub>2</sub> alpha receptor in the ovine corpus luteum in vivo and their role in hormone pulsatility. *Endocrine.* 3:761-764.
- Davis, J. S., Weakland, L. L., Weiland, D. A., Farese, R. V., West, L. A. 1987. Prostaglandin F<sub>2</sub> alpha stimulates phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate hydrolysis and mobilizes intracellular Ca<sup>2+</sup> in bovine luteal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 3728-3732.
- Davis, J. S., Alila, H. W., West, L. A., Corradino, R. A., Hansel, W. 1988. Acute effects of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  on inositol phospholipid hydrolysis in the large and small cells of the bovine corpus luteum. *Mol. Cell. Endocrinol.* 58, 43-50.
- Davis, S., Aldrich, T. H., Jones, P. F., Acheson, A., Compton, D. L., Jain, V., Ryan, TE., Bruno, J., Radziejewski, C. Maisonpierre., Yancopoulos, G. D. 1996. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87, 1161-1169.
- Davis, J. S., Rueda, B. R. 2002. The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. *Front Biosci*, 7, d1949-d1978.
- Davis, T.L., Bott, R.C., Slough, T.L., Bruemmer, J. E., Niswender, G.D. 2010. Progesterone inhibits oxytocin- and prostaglandin F<sub>2</sub>alpha-stimulated increases in intracellular calcium concentrations in small and large ovine luteal cells. *Biol. Reprod.* 82, 282-288.
- de Tarso, S. G. S., Gastal, G. D. A., Bashir, S. T., Gastal, M. O., Apgar, G. A., Gastal, E. L. 2017. Follicle vascularity coordinates corpus luteum blood flow and progesterone production. *Reproduction, Fertility and Development*, 29, 448-457.
- de Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., Williams, L. T. 1992. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 255, 989-991.
- Dey, S. K., Hoversland, R. C., Johnson, D. C. 1982. Phospholipase A<sub>2</sub> activity in the rat uterus: modulation by steroid hormones. *Prostaglandins*, 235, 619-630.
- Diaz, F. J., Anderson, L. E., Wu, Y. L., Rabot, A., Tsai, S. J., Wiltbank, M. C. 2002. Regulation of progesterone and prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  production in the CL. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191, 65-80.
- Diaz, F.J., Luo, W., Wiltbank M.C. 2011. Effect of decreasing intraluteal progesterone on sensitivity of the early porcine corpus luteum to the luteolytic actions of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha. *Biol. Reprod.* 84, 26-33.

- Dobson, H., Cooper, M. J., Furr, B. J. A. 1975. Synchronization of oestrus with ICI 79,939, an analogue of PGF $2\alpha$ , and associated changes in plasma progesterone, oestradiol-17 $\beta$  and LH in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 42, 141-144.
- Doerr, M. D., Goravanahally, M. P., Rhinehart, J. D., Inskoop, E. K., Flores, J. A. 2008. Effects of endothelin receptor type-A and type-B antagonists on prostaglandin F $2\alpha$ -induced luteolysis of the sheep corpus luteum. *Biol. Reprod.* 78, 688-696.
- Doraiswamy, V. Y., Knutson, D. L., Grazul-Bilska, A. T., Redmer, D. A., Reynolds, L. P. 1998. Fibroblast growth factor receptor FGFR-1 and-2 in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Growth Factors* 16, 125-135.
- dos Santos, R. M., Goissis, M. D., Fantini, D. A., Bertan, C. M., Vasconcelos, J. L. M., Binelli, M. 2009. Elevated progesterone concentrations enhance prostaglandin F $2\alpha$  synthesis in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 114, 62-71.
- Douglas, R. H., Ginther, O. J. 1973. Luteolysis Following a Single Injection of Prostaglandin F in Sheep. *J. Anim. Sci.* 37, 990-993.
- Doyle, L.K., Walker, C.A., Donadeu, F.X. 2010. VEGF modulates the effects of gonadotropins in granulosa cells. *Domest. Anim. Endocrinol.* 38, 127-137
- Dunlap, K. A., Stormshak, F. 2004. Nongenomic inhibition of oxytocin binding by progesterone in the ovine uterus. *Biol. Reprod.* 70, 65-69.
- Drummond A.E. Findlay J.K. 1999 The role of estrogen in folliculogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 151, 57-64.
- Duong, H.T., Vu, H.V., Bah, M.M., Woclawek-Potocka, I., Dam, T.V., Skarzynski, D.J., Okuda, K., Acosta, T.J. 2012. Acute changes in the concentrations of prostaglandin F $2\alpha$  PGF and cortisol in uterine and ovarian venous blood during PGF-induced luteolysis in cows. *Reprod. Dom. Anim.* 47, 238-243.
- Dutt, R. H., Casida, L. E. 1948. Alteration of the estrual cycle in sheep by use of progesterone and its effect upon subsequent ovulation and fertility. *Endocrinology*, 43, 208-217.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495-516.
- El-Sherry, T. M., Derar, R., Bakry, R. 2013. Changes in blood flow in ovine follicles and serum concentration of estradiol 17 beta E $2$  and nitric oxide NO around the time of ovulation in Ossimi ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 138, 188-193.
- Euler, U. V., Gaddum, J. H. 1931. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol.*, 72, 74-87.

- Fadhillah, Yoshioka, S., Nnishimura, R., Okuda, K. 2014. Hypoxia promotes progesterone synthesis during luteinization in bovine granulosa cells. *J. Reprod. Dev.* 60, 194-201.
- Fairclough, R.J.1, Lau, TM. 1992. Hormonal control of concentrations of endometrial oxytocin receptors in the ewe. *Reprod. Fertil. Dev.* 4:313-320.
- Farin, C., Moeller, C., Sawye R, H., Gamboni, F., Niswender, G. 1986. Morphometric Analysis of Cell Types in the Ovine Corpus Luteum throughout the Estrous Cycle. *Biol. Reprod.* 35, 1299-1308.
- Ferrara, N. 1999. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J. Mol. Med.* 77, 527-543.
- Fevold, H. L., Hisaw, F. L., Hellbaum, A., Hertz, R., 1933. Sex hormones of the anterior lobe of the hypophysis. *Am. J. Physiol. Legacy Content*, 104, 710-723.
- Fiedler, E. P. Plouffe Jr, L. Hales, D. B. Hales, K. H. Khan, I. 1999. Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  induces a rapid decline in progesterone production and steroidogenic acute regulatory protein expression in isolated rat corpus luteum without altering messenger ribonucleic acid expression. *Biology of reproduction*, 61, 643-650.
- Fierro, S., Olivera-Muzante, J., Gil, J., Viñoles, C. 2011. Effects of prostaglandin administration on ovarian follicular dynamics, conception, prolificacy, and fecundity in sheep. *Theriogenology*, 76, 630-639.
- Fierro, S., Gil J., Viñoles, C., Olivera-Muzante, J. 2013. The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. *Theriogenology* 79,399–408.
- Flint, A. P. F., Sheldrick, E. L. 1982. Ovarian secretion of oxytocin is stimulated by prostaglandin. *Nature*, 297, 587-588.
- Flint, A. P. F., Sheldrick, E. L. 1983. Evidence for a systemic role for ovarian oxytocin in luteal regression in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 67, 215-225.
- Flint, A.P.F., Sheldrick, E.L., McCann, T.J., Jones, D.S. C. 1990. Luteal oxytocin: characteristics and control of synchronous episodes of oxytocin and PGF<sub>2</sub> $\alpha$  secretion at luteolysis in ruminants. *Domest. Anim. Endocrinol.* 7,111-124.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182-1186.
- Folkman, J., Klagsbrun, M. 1987. Angiogenic factors. *Science* 235, 442-448.
- Fujii, J., Iuchi, Y., Okada, F. 2005. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 31, 43.
- Funk, C.D. 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 294, 1871-1875.

- Gadkar-Sable, S., Shah, C., Rosario, G., Sachdeva, G., Puri, C. 2005. Progesterone receptors: various forms and functions in reproductive tissues. *Front. Biosci.* 10, 2118-2130.
- Gale, N. W., Thurston, G., Hackett, S. F., Renard, R., Wang, Q., McClain, J., Martin C., Witte CH., Witte MH., Jackson, D., Suri C., Campochiaro P.A., Wlegand S.J., Yancopoulos G.D. 2002. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev. Cell.* 33, 411-423.
- García-Robles, R., Ayala Ramírez, P., Acosta Vega, N. 2009. Alteration of Regulation of Fas/FasL Mediated Apoptosis in Gastric Cancer. *Revista Ciencias de la Salud*, 71, 83-94.
- Gerhardt, H., Betsholtz, C. 2003. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell. Tissue Res.* 314, 15-23.
- Gibson, T. C., Phernetton, T. M., Wiltbank, M. C., Magness, R. R. 2004. Development and use of an ovarian synchronization model to study the effects of endogenous estrogen and nitric oxide on uterine blood flow during ovarian cycles in sheep. *Biol. Reprod.* 70, 1886-1894.
- Gijón, M. A., Leslie, C. C. 1999. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. *J. Leukocyte Biol.* 65, 330-336.
- Ginther, O. J., Silva, L. A., Araujo, R. R., Beg, M. A. 2007. Temporal associations among pulses of 13, 14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2</sub>α, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. *Biol. Reprod.* 76, 506-513.
- Ginther, O. J., Siddiqui, M. A. R., Beg, M. A. 2009. Physiologic and nonphysiologic effects of exogenous prostaglandin F<sub>2</sub>α on reproductive hormones in mares. *Theriogenology*, 72, 417-424.
- Ginther, O. J., Shrestha, H. K., Fuenzalida, M. J., Shahiduzzaman, A. K. M., Beg, M. A. 2010a. Characteristics of pulses of 13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin F<sub>2</sub>α before, during, and after spontaneous luteolysis and temporal intrapulse relationships with progesterone concentrations in cattle. *Biol. Reprod.* 82, 1049-1056.
- Ginther, O. J., Shrestha, H. K., Beg, M. A. 2010b. Circulating hormone concentrations within a pulse of a metabolite of prostaglandin F<sub>2</sub>α during preluteolysis and early luteolysis in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 122, 253-258.
- Ginther, O. J., Shrestha, H. K., Fuenzalida, M. J., Imam, S., Beg, M. A. 2010c. Stimulation of pulses of 13, 14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2</sub>α PGFM with estradiol-17β and changes in circulating progesterone concentrations within a PGFM pulse in heifers. *Theriogenology* 74, 384-392.
- Ginther, O. J., Shrestha, H. K., Fuenzalida, M. J., Shahiduzzaman, A. K. M., Hannan, M. A., Beg, M. A. 2010d. Intrapulse temporality between pulses of a metabolite of prostaglandin F<sub>2</sub>α and circulating concentrations of progesterone before, during, and after spontaneous luteolysis in heifers. *Theriogenology*, 74, 1179-1186.

- Ginther, O. J., Fuenzalida, M. J., Shrestha, H. K., Beg, M. A. 2011. Concomitance of luteinizing hormone and progesterone oscillations during the transition from preluteolysis to luteolysis in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 40, 77-86.
- Ginther, O.J., Beg, MA. 2012a. Dynamics of circulating progesterone concentrations before and during luteolysis: a comparison between cattle and horses. *Biol. Reprod.* 86,1-12.
- Ginther, O. J., Beg, M. A. 2012b. Dynamics of circulating progesterone concentrations before and during luteolysis: a comparison between cattle and horses. *Biol. Reprod.* 86, 170-171.
- Ginther, O. J. 2013. Pitfalls in animal reproduction research: How the animal guards nature's secrets. *Theriogenology*, 80, 169-175.
- Girsh, E., Greber, Y., Meidan, R. 1995. Luteotrophic and luteolytic interactions between bovine small and large luteal-like cells and endothelial cells. *Biol. Reprod.* 52, 954-962.
- Godfrey, R. W., Gray, M. L., Collins, J. R. 1997. A comparison of two methods of oestrous synchronisation of hair sheep in the tropics. *Anim. Reprod. Sci.* 47, 99-106.
- Goding, J.R. 1974. The demonstration that PGF $2\alpha$  is the uterine luteolysin in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* 38, 261–271.
- Goff, A. K. 2004. Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 71, 11-16.
- Goodman, R. L., Holaskova, I., Nestor, C. C., Connors, J. M., Billings, H. J., Valent, M., Lehman, M.N., Stanley, M., Hileman, S. M. 2011. Evidence that the arcuate nucleus is an important site of progesterone negative feedback in the ewe. *Endocrinology*, 152, 3451-3460.
- Goodman, R. L., Hileman, S. M., Nestor, C. C., Porter, K. L., Connors, J. M., Hardy, S. L., Millar, R.P., Cernea, M., Coolen, L.M., Lehman, M.N. 2013. Kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin act in the arcuate nucleus to control activity of the GnRH pulse generator in ewes. *Endocrinology*, 154, 4259-4269.
- Goyeneche, A.A., Martinez, I.L., Deis, R.P., Gibori G., Telleria C.M. 2003. In vivo hormonal environment leads to differential susceptibility of the corpus luteum to apoptosis in vitro. *Biol. Reprod.* 68, 2322–2330
- Graham, J. D., Clarke, C. L. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* 18, 502-519.
- Granados-Villarreal, L. M. Zarco, L. Mejía, O. Sánchez-Torres, M. T. Pablos-Hach, J. L. 2017. Luteolytic efficiency of reduced doses of cloprostenol in the ewe. Effect of progesterone concentrations at the time of treatment. *Anim. Reprod. Sci.* 186, 68-76.

- Granström, E., Samuelsson, B. 1972. Development and mass spectrometric evaluation of a radioimmunoassay for 9 $\alpha$ , 11 $\alpha$ -dihydroxy-15-ketoprost-5-enoic acid. *FEBS letters*, 26, 211-214.
- Granström, E., Kindahl, H. 1982. Species differences in circulating prostaglandin metabolites relevance for the assay of prostaglandin release. *Biochim. Biophys. Acta*. 713, 555-569.
- Graves, P. E., Pierce, K. L., Bailey, T. J., Rueda, B. R., Gil, D. W., Woodward, D. F., Yool, A.J., Hoyer, P.B., Regan, J.W. 1995. Cloning of a receptor for prostaglandin F2 alpha from the ovine corpus luteum. *Endocrinology* 136, 3430-3436.
- Grazul-Bilska, A. T., Redmer, D. A., Jablonka-Shariff, A., Biondini, M. E., Reynolds, L. P. 1995. Proliferation and progesterone production of ovine luteal cells from several stages of the estrous cycle: effects of fibroblast growth factors and luteinizing hormone. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73, 491-500.
- Grazul-Bilska, A. T., Navanukraw, C., Johnson, M. L., Arnold, D. A., Reynolds, L. P., Redmer, D. A. 2006. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Reproduction*, 132, 579-587.
- Grazul-Bilska, A. T., Navanukraw, C., Johnson, M. L., Vonnahme, K. A., Ford, S. P., Reynolds, L. P., Redmer, D. A. 2007. Vascularity and expression of angiogenic factors in bovine dominant follicles of the first follicular wave. *J. Anim. Sci.* 85, 1914-1922.
- Grazzini, E., Guillon, G., Mouillac, B., Zingg, H.H. 1998. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature* 392, 509-512.
- Greene, J. M., Ginther, O. J. 2015. Circulating nitric oxide metabolites during luteolysis and the effect of luteinizing hormone on circulating nitric oxide metabolites in heifers. *Theriogenology*, 83, 213-221.
- Guo N., Meng C.H., Wujiao B., Wei Q., Shi F., Davis, J.S., Mao D. 2015. Prostaglandin F2a induces expression of activating transcription factor 3 ATF3 and activates MAPK signaling in the rat corpus luteum. *Acta Histochem.* 117:211-218.
- Hackett, A.J., Robertson, H.A. 1980. Effect of dose and time of injection of prostaglandin F2 $\alpha$  in cycling ewes. *Theriogenology* 13,347-351.
- Hagen, T., Taylor, C. T., Lam, F., Moncada, S. 2003. Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1 $\alpha$ . *Science* 302, 1975-1978.
- Haresign, W., Acritopoulou, S.A. 1978. Controlled breeding in sheep using the prostaglandin analogue, ICI 80996. *Livest. Prod. Sci.* 5, 313-319.



- Hawkins, D. E., Belfiore, C. J., Kile, J. P., Niswender, G. D. 1993. Regulation of messenger ribonucleic acid encoding  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$  isomerase in the ovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 48, 1185-1190.
- Hayashi, K., Acosta, T. J., Berisha, B., Kobayashi, S. I., Ohtani, M., Schams, D., Miyamoto, A. 2003. Changes in prostaglandin secretion by the regressing bovine corpus luteum. *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* 70, 339-349.
- Heath, E., Weinstein, P., Merritt, B., Shanks, R., Hixon, J. 1983. Effects of prostaglandins on the bovine corpus luteum: granules, lipid inclusions and progesterone secretion. *Biol. Reprod.* 29, 977-985.
- Helliwell, R. J., Berry, E. B., O'Carroll, S. J., Mitchell, M. D. 2004. Nuclear prostaglandin receptors: role in pregnancy and parturition? *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70, 149-165.
- Hernández-Cerón, J., Valencia, M.J., Zarco, Q.L. 2001. Regresión del cuerpo lúteo y presentación del estro en ovejas con dos inyecciones de prostaglandina con 8 días de intervalo. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 39, 53-58.
- Hernández-Cerón, J., Kindahl, H., Valencia Méndez, J., Zarco Quintero, L. 2004. Desarrollo folicular, concentraciones de FSH, estradiol y MPGF2 asociado con persistencia lutea inducida por la administración de líquido folicular equino libre de esteroides en la oveja. *Vet. Mex.* 35, 1-12.
- Herrera, H.L., Feldman, S.D., Zarco, Q.L., Valencia M.J., Ortíz H.A., Angeles C.S. 1990. Evaluación del efecto luteolítico de la prostaglandina F2 alfa en diferentes días del ciclo estral de la borrega. *Vet. Mex.* 21, 143-147.
- Hinckley, S. T., Milvae, R. A. 2001. Endothelin-1 mediates prostaglandin F2 $\alpha$ -induced luteal regression in the ewe. *Biol. Reprod.* 64, 1619-1623.
- Hoppe, K.F., Slyter A.L. 1989. Effects of prostaglandin F2 $\alpha$  dosage on synchronizing ovine estrus using a modified single injection regimen. *Theriogenology* 31, 1191-1200.
- Houck, K. A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., Leung, D. W. 1991. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol.* 5, 1806-1814.
- Hughes, F., Lucas, J.M.S., Notman, A.B. 1976. The synchronization of oestrus and subsequent fertility in ewes following treatment with a synthetic prostaglandin analogue ONO 453. *Prostaglandins* 11, 1033-1039.
- Hughes, C. C. 2008. Endothelial-stromal interactions in angiogenesis. *Curr. Opin. Hematol.* 15, 204-209.
- Hutt, K. J. 2015. The role of BH3-only proteins in apoptosis within the ovary. *Reproduction* 149, R81-R89.

- Imam, S., Shrestha, H. K., Beg, M. A., Ginther, O. J. 2010. Intrapulse changes in progesterone and LH concentrations and luteal blood flow during an estradiol-induced pulse of a metabolite of prostaglandin F2 $\alpha$  in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 121, 34-38.
- Ingman, W. V., Robertson, S. A. 2002. Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction. *Bioessays* 24, 904-914.
- Inskeep, E. K. 1973. Potential uses of prostaglandins in control of reproductive cycles of domestic animals. *J. Anim. Sci.* 36, 1149-1157.
- Jankowski, M., Wang, D., Hajjar, F., Mukaddam-Daher, S., McCann, S. M., Gutkowska, J. 2000. Oxytocin and its receptors are synthesized in the rat vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 6207-6211.
- Jing, J., Jiang, X., Chen, J., Yao, X., Zhao, M., Li, P. Pan Y., Ren Y., Liu W., Lyu, L. 2017. Notch signaling pathway promotes the development of ovine ovarian follicular granulosa cells. *Anim. Reprod. Sci.* 181, 69-78.
- Johnson, J. Espinoza, T. McGaughey, R. W. Rawls, A. Wilson-Rawls, J. 2001. Notch pathway genes are expressed in mammalian ovarian follicles. *Mech. Dev.* 109, 355-361.
- Juengel, J.L., Wiltbank, M.C., Meberg, B.M., Niswender, G.D. 1996. Regulation of steady-state concentrations of messenger ribonucleic acid encoding prostaglandin F2 $\alpha$  receptor in ovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 54, 1096-1102.
- Juengel, J. L., Larrick, T. L., Meberg, B. M., Niswender, G. D. 1998. Luteal expression of steroidogenic factor-1 mRNA during the estrous cycle and in response to luteotropic and luteolytic stimuli in ewes. *Endocrine* 9, 227-232.
- Juengel, J.L., Haworth, J.D., Rollyson, M.K., Silva, P.J., Sawyer, H.R., Niswender, G.D. 2000. Effects of dose of prostaglandin F2 $\alpha$  on steroidogenic components and oligonucleosomes in ovine luteal tissue. *Biol. Reprod.* 62, 1047-1051.
- Kalebic, T., Garbisa, S., Glaser, B., Liotta, L. A. 1983. Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. *Science* 221, 281-283.
- Kastelic, J. P., Bergfelt, D. R., Ginther, O. J. (1990). Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*, 33, 1269-1278.
- Kato, H., Sugino, N., Takiguchi, S., Kashida, S., Nakamura, Y. 1997. Roles of reactive oxygen species in the regulation of luteal function. *Rev. Reprod.* 22, 81-83.

- Kawaguchi, S., Bowolaksono, A., Yoshioka, S., Sakumoto, R., Okuda, K. 2013. Luteoprotective mechanisms of prostaglandin F2 $\alpha$  stimulated by luteinizing hormone in the bovine corpus luteum. *J. Reprod. Dev.* 59, 225-230.
- Kennedy, R.A., Coleman, P.P.A., Humprey, G.P., Levy, P.I. 1982. Studies on the characterisation of prostanoid receptors: A proposed classification. *Prostaglandins* 24, 667- 689.
- Kim, J., Bagchi, I. C., Bagchi, M. K. 2009. Signaling by hypoxia-inducible factors is critical for ovulation in mice. *Endocrinology* 150, 3392-3400.
- Kindahl, H., Edqvist, L. E., Granström, E., Bane, A. 1976. The release of prostaglandin F2 $\alpha$  as reflected by 15-keto-13, 14-dihydroprostaglandin F2 $\alpha$  in the peripheral circulation during normal luteolysis in heifers. *Prostaglandins*, 11, 871-878.
- Kleine, B., Rossmanith, W. G. 2016. *Hormones and the Endocrine System: Textbook of Endocrinology*. Springer, 2016.
- Ko, C., Gieske, M. C., Al-Alem, L., Hahn, Y., Su, W., Gong, M. C., Iglarz M., Koo, Y. 2006. Endothelin-2 in ovarian follicle rupture. *Endocrinology*, 147, 1770-1779.
- Kobayashi, S., Miyamoto, A., Berisha, B., Schams, D. 2001a. Growth hormone, but not luteinizing hormone, acts with luteal peptides on prostaglandin F2 $\alpha$  and progesterone secretion by bovine corpora lutea in vitro. *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* 63, 79-92.
- Kobayashi, S., Berisha, B., Amselgruber, W. M., Schams, D., Miyamoto, A. 2001b. Production and localisation of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2 alpha. *J. Endocrinol.* 170,369-380.
- Koblizek, T. I. Weiss, C. Yancopoulos, G. D. Deutsch, U. Risau, W. 1998. Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Current Biol.* 89, 529-532.
- Kozai, K., Tokuyama, S., Szóstek, A. Z., Toishi, Y., Tsunoda, N., Taya, K., Sakatani, M., Takahashi, M., Nambo, Y., Skarzynski, D., Yamamoto, Y., Kimura, K., Okuda, K. 2016. Evidence for a PGF2 $\alpha$  auto-amplification system in the endometrium in mares. *Reproduction*, 151, 517-526.
- Kumagai, A., Yoshioka, S., Sakumoto, R., Okuda, K. 2014. Auto-amplification system for prostaglandin F2 $\alpha$  in bovine corpus luteum. *Mol. Reprod. Dev.* 81, 646-654.
- Kumar, S. 1997. The apoptotic cysteine protease CPP32. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 393-396.

- Laird, M., Woad, K. J., Hunter, M. G., Mann, G. E., Robinson, R. S. 2013. Fibroblast growth factor 2 induces the precocious development of endothelial cell networks in bovine luteinising follicular cells. *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 372-386.
- Lauderdale, J. W., Seguin, B. E., Stellflug, J. N., Chenault, J. R., Thatcher, W. W., Vincent, C. K. Loyancano, A. F. 1974. Fertility of cattle following PGF injection. *J. Anim. Sci.* 38, 964-967.
- Lee, S., Acosta, T. J., Nakagawa, Y., Okuda, K. 2010. Role of nitric oxide in the regulation of superoxide dismutase and prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  production in bovine luteal endothelial cells. *J. Reprod. Dev.* 56, 454-459.
- Lee, J., McCracken, J. A., Stanley, J. A., Nithy, T. K., Banu, S. K., Arosh, J. A. 2012. Intraluteal prostaglandin biosynthesis and signaling are selectively directed towards PGF<sub>2</sub> $\alpha$  during luteolysis but towards PGE<sub>2</sub> during the establishment of pregnancy in sheep. *Biol. Reprod.* 87, 97-1.
- Lee, J., McCracken, J. A., Banu, S. K., Arosh, J. A. 2013. Intrauterine inhibition of prostaglandin transporter protein blocks release of luteolytic PGF<sub>2</sub> $\alpha$  pulses without suppressing endometrial expression of estradiol or oxytocin receptor in ruminants. *Biol. Reprod.* 89, 27-1.
- Levy, N., Kobayashi, S. I., Roth, Z., Wolfenson, D., Miyamoto, A., Meidan, R. 2000. Administration of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  during the early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and of its type A receptor: a possible cause for corpus luteum refractoriness. *Biol. Reprod.* 63, 377-382
- Li, J., Brown, L. F., Hibberd, M. G., Grossman, J. D., Morgan, J. P., Simons, M. 1996. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 270, H1803-H1811.
- Madore, E., Harvey, N., Parent, J., Chapdelaine, P., Arosh, J. A., Fortier, M. A. 2003. An aldose reductase with 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  in the bovine endometrium. *J. Biol. Chem.* 278, 11205-11212.
- Mann, G. E. Merson, P. Fray, M. D. Lamming, G. E. 2001. Conception rate following progesterone supplementation after second insemination in dairy cows. *Vet.J. London, England: 1997,162, 161-162*
- Mann, G. E., Lamming, G. E. 2006. Timing of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  release episodes and oxytocin receptor development during luteolysis in the cow. *Anim. Reprod. Sci.* 93, 328-336.
- Mao, D., Hou, X., Talbot, H., Cushman, R., Cupp, A., Davis, J. 2013. ATF3 expression in the corpus luteum: Possible role in luteal regression. *Mol. Endocrinol.* 27:2066-2079.
- Mares, S. E., Zimbelman, R. G., Casida, L. E. 1962. Variation in progesterone content of the bovine corpus luteum of the estrual cycle. *J. Anim. Sci.* 21, 266-271.

- Matthews, W., Jordan, C. T., Gavin, M., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Lemischka, I. R. 1991. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 9026-9030.
- McCracken, J.A., Glew, M.E. S.J., Scaramuzzi, R.J. 1970. Corpus luteum regression induced by prostaglandin F2 $\alpha$ . *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 30, 544–546.
- McCracken, J. 1971. Prostaglandin F2 $\alpha$  and corpus luteum regression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 180, 456-469.
- McCracken, J. A., Carlson, J. C., Glew, M. E., Goding, J. R., Baird, D. T., Green, K., Samuelsson, B. 1972. Prostaglandin F2 $\alpha$  identified as a luteolytic hormone in sheep. *Nature*, 238, 129-134.
- McCracken, J. A., Schramm, W., Okulicz, W. C. 1984. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF2 $\alpha$  from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 7, 31-55.
- McCracken, J. A., Custer, E. E., Lamsa, J. C. 1999. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol. Rev.* 79, 263-323.
- McCracken, J. A., Custer, E. E., Schreiber, D. T., Tsang, P. C. W., Keator, C. S., Arosh, J. A. 2012. A new in vivo model for luteolysis using systemic pulsatile infusions of PGF2 $\alpha$ . *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* 97, 90-96.
- McGuire, W.J., Juengel, J.L., Niswender, G.D. 1994. Protein kinase c second messenger system mediates the antisteroidogenic effects of prostaglandin F2 alpha in the ovine corpus luteum in vivo. *Biol. Reprod.* 51, 800-806.
- Meidan, R., Levy, N. 2002. Endothelin-1 receptors and biosynthesis in the corpus luteum: molecular and physiological implications. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 287-298.
- Meidan, R., Levy, N., Kisliouk, T., Podlovny, L., Rusiansky, M., Klipper, E. 2005. The yin and yang of corpus luteum-derived endothelial cells: balancing life and death. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29, 318-328.
- Meidan, R. 2017. *The Life Cycle of the Corpus Luteum*. Ed. Springer, 2017.
- Messinis, I. E., Messini, C. I., Dafopoulos, K. 2009. Luteal-phase endocrinology. *Reprod. Biomed. Online*, 19, 15-29.
- Millauer, B., Wizigmann-Voos, S., Schnürch, H., Martinez, R., Møller, N. P. H., Risau, W., Ullrich, A. 1993. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72, 835-846.

- Milvae, R. A., Hansel, W. 1983. Prostacyclin, prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  and progesterone production by bovine luteal cells during the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 29, 1063-1068.
- Miyamoto, A., Shirasuna, K., Wijayagunawardane, M. P. B., Watanabe, S., Hayashi, M., Yamamoto, D., Matsui M., Acosta, T. J. 2005. Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29, 329-339.
- Miyamoto, A., Shirasuna, K., Sasahara, K. 2009. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: impact of angiogenic and vasoactive factors. *Domest. Anim. Endocrinol.* 37, 159-169.
- Moncada, S., Palmer, R. M.J., Higgs, E.A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109-142.
- Morita, I., Schindler, M., Regier, M. K., Otto, J. C., Hori, T., DeWitt, D. L., Smith, W. L. 1995. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and- 2. *J. Biol. Chem.* 270, 10902-10908.
- Murdoch, W. J., Peterson, T. A., Van Kirk, E. A., Vincent, D. L., Inskeep, E. K. 1986. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biol. Reprod.* 35, 1187.
- Murta, D. Batista, M. Silva, E. Trindade, A. Mateus, L. Duarte, A. Lopes-da-Costa, L. 2015. Differential expression of Notch component and effector genes during ovarian follicle and corpus luteum development during the oestrous cycle. *Reprod. Fertil. Dev.* 27, 1038-1048.
- Narumiya, S. Sugimoto, Y. Ushikubi, F. 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79, 1193-1226.
- Needle, E., Piparo, K., Cole, D., Worrall, C., Whitehead, I., Mahon, G., Goldsmith, L. T. 2007. Protein kinase A-independent cAMP stimulation of progesterone in a luteal cell model is tyrosine kinase dependent but phosphatidylinositol-3-kinase and mitogen-activated protein kinase independent. *Biol. Reprod.* 77, 147-155.
- Nett, T. M. McClellan, M. C. Niswender, G. D. 1976. Effects of prostaglandins on the ovine corpus luteum: blood flow, secretion of progesterone and morphology. *Biol. Reprod.* 15, 66-78.
- Neuvians, T. P., Berisha, B., Schams, D. 2004. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) expression during induced luteolysis in the bovine corpus luteum. *Mol. Reprod. Dev.* 67, 389-395.
- Nishimura, R., Okuda, K. 2010. Hypoxia is important for establishing vascularization during corpus luteum formation in cattle. *J. Reprod. Dev.* 56, 110-116.
- Niswender, G. D., Moore, R. T., Akbar, A. M., Nett, T. M., Diekman, M. A. 1975. Flow of blood to the ovaries of ewes throughout the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 13, 381-388.

- Niswender, G. D., Reimers, T. J., Diekman, M. A., Nett, T. M. 1976. Blood flow: a mediator of ovarian function. *Biol. Reprod.* 14, 64-81.
- Niswender, G.D., Juengel J.L., Silva P.J., Rollyson K.M., McIntush E.W. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.* 80:1-29.
- Nomura, T., Lu, R., Pucci, M. L., Schuster, V. L. 2004. The two-step model of prostaglandin signal termination: in vitro reconstitution with the prostaglandin transporter and prostaglandin 15 dehydrogenase. *Mol. Pharmacol.* 65, 973-978.
- O'Grady, J.P., Kohorn, E.I., Glass, R.H., Caldwell, B.V., Brock, W.A., Speroff, L. 1972. Inhibition of progesterone synthesis in vitro by prostaglandin F<sub>2α</sub>. *J. Reprod. Fertil.* 301, 153-156.
- Ohmichi, M., Koike, K., Kimura, A., Masuhara, K., Ikegami, H., Ikebuchi, Y., Kanzaki, T., Touhara, K., Sakaue, M., Kobayashi, Y., Akabane, M., Miyake, A., Murata, Y. 1997. Role of mitogen-activated protein kinase pathway in prostaglandin F<sub>2α</sub>-induced rat puerperal uterine contraction. *Endocrinology* 138, 3103-3111.
- Okita, R. T., Okita, J. R. 1996. Prostaglandin-metabolizing enzymes during pregnancy: characterization of NAD<sup>+</sup>-dependent prostaglandin dehydrogenase, carbonyl reductase, and cytochrome P450-dependent prostaglandin omega-hydroxylase. *Critical Rev. Biochem. Mol. Biol.* 31, 101-126
- Okuda, K., Miyamoto, Y., Skarzynski, D. J. 2002. Regulation of endometrial prostaglandin F 2 $\alpha$  synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. *Dom. Anim. Endocrinol.* 23, 255-264.
- Okuda, K., Korzekwa, A., Shibaya, M., Murakami, S., Nishimura, R., Tsubouchi, M., Woclawek-Potocka, I., Skarzynski, D. J. 2004. Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells. *Biol. Reprod.* 71, 2065-2071.
- Olivera, M., Tarazona, A., Ruíz, T., Giraldo, C. 2007. Vías implicadas en la luteólisis bovina. *Rev Col Cienc Pec* 2007; 20:387-393
- Olivera-Muzante, J., Fierro, S., López, V., Gil, J. 2011a. Comparison of prostaglandin-and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, 75, 1232-1238.
- Olivera-Muzante J., Gil J., Fierro S., Menchaca A., Rubianes E. 2011b. Alternatives to improve a prostaglandin-based protocol for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 76,1501–1507.
- Ortman, R. 2000. Monitoring of estrous cycle of ewes by ram-seeking behaviour. *Small Rum. Res.* 37, 73-84
- Pardali, E., ten Dijke, P. 2009. Transforming growth factor-beta signaling and tumor angiogenesis. *Front Biosc.* (Landmark edition), 14, 4848-4861.

- Purvis, J.L., Canick, J.A., Latif, S.A., Rosenbaum, J.H., Hologgitas, J., Menard, R.H. 1973. Lifetime of microsomal cytochrome P-450 and steroidogenic enzymes in rat testis as influenced by human chorionic gonadotrophin. *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 39-49.
- Patan, S. 2000. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J. Neurooncol.* 50, 1-15.
- Pate, J. L., Johnson-Larson, C. J., Ottobre, J. S. 2012. Life or death decisions in the corpus luteum. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 297-303.
- Pepper, M. S. 2001. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator–plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1104-1117.
- Petersen, S. L., Intlekofer, K. A., Moura-Conlon, P. J., Brewer, D. N., Pino Sans, J., Lopez, J. A. 2013. Nonclassical progesterone signalling molecules in the nervous system. *J. Neuroendocrinol.* 25, 991-1001.
- Pharriss, B. B., Wyngarden, L. J. 1969. The effect of prostaglandin F2 $\alpha$  on the progesterone content of ovaries from pseudopregnant rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130, 92-94.
- Pope, WF., Cárdenas, H. 2004. Sensitivity of sheep to exogenous prostaglandin F2a early in the estrous cycle. *Small Rum. Res.* 55: 245-248.
- Portela, V. M., Dirandeh, E., Guerrero-Netro, H. M., Zamberlam, G., Barreta, M. H., Goetten, A. F., Price, C. A. 2015. The role of fibroblast growth factor-18 in follicular atresia in cattle. *Biol. Reprod.* 92, 14-1.
- Powers, C. J., McLeskey, S. W., Wellstein, A. 2000. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer*, 73, 165-197.
- Pratt, B. R., Butcher, R. L., Inskeep, E. K. 1977. Antiluteolytic effect of the conceptus and of PGE in ewes. *J. Anim. Sci.* 45, 784-791.
- Rawlings, N. C. Evans, A. C. O. Honaramooz, A. Bartlewski, P. M. 2003. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Animal reproduction science*, 78, 259-270.
- Redmer, D.A., Reynolds, L.P. 1996. Angiogenesis in the ovary. *Rev. Reprod.* 1, 182-192.
- Répassi, A., Beckers, J. F., Sulon, J., Karen, A., Reiczigel, J., Szenci, O. 2005. Effect of the type and number of prostaglandin treatments on corpus luteum, the largest follicle and progesterone concentration in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 40, 436-442.
- Reynolds, L. P., Grazul-Bilska, A. T., Redmer, D. A. 2000. Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine* 12, 1-9.



- Risau, W., Sariola, H., Zerwes, H.G., Sasse, J., Eklom, P., Kemler, R., Doetschman, T. 1988. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Develop.* 102, 471-478.
- Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674..
- Rissman, E. F. 2008. Roles of oestrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in behavioural neuroendocrinology: beyond Yin/Yang. *J. Neuroendocrinol.* 20, 873-879.
- Rizzo, A., Roscino, M. T., Binetti, F., Sciorsci, R. L. 2012. Roles of reactive oxygen species in female reproduction. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 344-352.
- Roberts, A. J., Dunn, T. G., Murdoch, W. J. 1985. Induction of ovulation in proestrous ewes: identification of the ovulatory follicle and functional status of the corpus luteum. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2, 207-210.
- Robinson, R. S., Woad, K. J., Hammond, A. J., Laird, M., Hunter, M. G., Mann, G. E. 2009. Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction* 138, 869-881.
- Roche, J. F. 1974. Synchronization of oestrus and fertility following artificial insemination in heifers given prostaglandin F2 $\alpha$ . *J. Reprod. Fertil.* 37, 135-138.
- Rodgers, R. J., Vella, C. A., Young, F. M., Tian, X. C., Fortune, J. E. 1995. Concentrations of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme and 3 beta-hydroxysteroid deshydrogenase during prostaglandin F2 alpha-induced luteal regression in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 1213-1216.
- Rosales-Torres, A. M., Alonso, I., Vergara, M., Romano, M. C., Castillo-Juárez, H., Ávalos, A., Rosado A., Gutiérrez, C. G. 2010. Vascular endothelial growth factor isoforms 120, 164 and 205 are reduced with atresia in ovarian follicles of sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 122, 111-117.
- Rosiansky-Sultan, M., Klipper, E., Spanel-Borowski, K., Meidan, R. 2006. Inverse relationship between nitric oxide synthases and endothelin-1 synthesis in bovine corpus luteum: interactions at the level of luteal endothelial cell. *Endocrinology* 147, 5228-5235.
- Rosselli, M., Keller, R. J., Dubey, R. K. 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reprod. Update*, 4, 3-24.
- Rubianes, E., Menchaca, A., Carbajal, B. 2003. Response of the 1–5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2 $\alpha$ . *Anim. Reprod. Sci.* 78, 47-55.
- Rueda, B. R., Hendry, I. R., Tilly, J. L., Hamernik, D. L. 1999. Accumulation of caspase-3 messenger ribonucleic acid and induction of caspase activity in the ovine corpus luteum following prostaglandin F2 $\alpha$  treatment in vivo. *Biol. Reprod.* 60, 1087-1092.

- Rueda, B. R., Hendry, I. R., Hendry III, W. J., Stormshak, F., Slayden, O. D. Davis, J. S. 2000. Decreased progesterone levels and progesterone receptor antagonists promote apoptotic cell death in bovine luteal cells. *Biol. Reprod.* 62, 269-276.
- Samuelsson, B., Green, K. 1974. Endogenous levels of 15-keto-dihydro-prostaglandins in human plasma: Parameters for monitoring prostaglandin synthesis. *Biochem. Med.* 11, 298-303.
- Schams, D., Kosmann, M., Berisha, B., Amselgruber, W. M., Miyamoto, A. 2001. Stimulatory and synergistic effects of luteinising hormone and insulin like growth factor 1 on the secretion of vascular endothelial growth factor and progesterone of cultured bovine granulosa cells. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 109, 155-162.
- Schams D., Berisha B. 2002. Angiogenic factors VEGF, FGF and IGF in the bovine corpus luteum. *J. Reprod. Dev.* 48, 233-242.
- Schams, D., Berisha, B. 2004. Regulation of corpus luteum function in cattle—an overview. *Reprod. Domest. Anim.* 39, 241-251.
- Schuster, V. L. 2002. Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* 68, 633-647.
- Senger, P. L. 2003. Reproductive cyclicity-the luteal phase. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2nd Edition. p, 188.
- Sheldrick, E. L., Flint, A. P. F. 1983. Regression of the corpora lutea in sheep in response to cloprostenol is not affected by loss of luteal oxytocin after hysterectomy. *J. Reprod. Fertil.* 68, 155-160.
- Sheldrick, E. L., Flint, A. P. F. 1984. Ovarian oxytocin and luteal function in the early pregnant sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 7, 101-113.
- Shimizu, T., Miyamoto, A. 2007. Progesterone induces the expression of vascular endothelial growth factor VEGF 120 and Flk-1, its receptor, in bovine granulosa cells. *Anim. Reprod. Sci.* 102, 228-237.
- Shirasuna, K., Watanabe, S., Asahi, T., Wijayagunawardane, M. P., Sasahara, K., Jiang, C., Matsui, M., Sasaki, M., Shimizu, T., Davis, J.S., Miyamoto, A. 2008. Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  increases endothelial nitric oxide synthase in the periphery of the bovine corpus luteum: the possible regulation of blood flow at an early stage of luteolysis. *Reproduction*, 135, 527-539.
- Shirasuna, K. 2010. Nitric oxide and luteal blood flow in the luteolytic cascade in the cow. *J. Reprod. Dev.* 56, 9-14.
- Shirasuna, K., Sasahara, K., Matsui, M., Shimizu, T., Miyamoto, A. 2010b. Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  differentially affects mRNA expression relating to angiogenesis, vasoactivation and prostaglandins in the early and mid corpus luteum in the cow. *J. Reprod. Dev.* 56, 428-436.

- Shirasuna, K., Akabane, Y., Beindorff, N., Nagai, K., Sasaki, M., Shimizu, T., Bollwein, H., Meidan, R., Miyamoto, A. 2012a. Expression of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  PGF<sub>2</sub> $\alpha$  receptor and its isoforms in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and PGF<sub>2</sub> $\alpha$ -induced luteolysis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 43, 227-238.
- Shirasuna, K., Nitta, A., Sineenard, J., Shimizu, T., Bollwein, H., Miyamoto, A. 2012b. Vascular and immune regulation of corpus luteum development, maintenance, and regression in the cow. *Domest. Anim. Endocrinol.* 43, 198-211.
- Shrestha, H.K., Beg, M.A., Imam S., Ginther, O.J. 2010. Luteal blood flow and concentrations of circulating progesterone and other hormones associated with a simulated pulse of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  in heifers. *Reproduction* 139, 673–683.
- Shrestha, H. K., Beg, M. A., Burnette, R. R., Ginther, O. J. 2012. Plasma clearance and half-life of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ : a comparison between mares and heifers. *Biol. Reprod.* 87, 18-1-6.
- Silva, P.J., Juengel, J.L., Rollyson, M.K., Niswender, G.D. 2000. Prostaglandin metabolism in the ovine corpus luteum: Catabolism of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  PGF<sub>2</sub> $\alpha$  coincides with resistance of the corpus luteum to PGF<sub>2</sub> $\alpha$ . *Biol. Reprod.* 63, 1229–1236.
- Silvera, L., Barrios, C. 2012. La matriz extracelular: el ecosistema de la célula. *Salud Uninorte. Barranquilla Col.* 16, 9-18.
- Silvia, W. J., Ottobre, J. S., Inskeep, E. K. 1984. Concentrations of prostaglandins E<sub>2</sub>, F<sub>2</sub> $\alpha$  and 6-keto-prostaglandin F<sub>1</sub> $\alpha$  in the utero-ovarian venous plasma of nonpregnant and early pregnant ewes. *Biol. Reprod.* 30, 936-944.
- Simoncini, T., Genazzani, A. R. 2003. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur.J. Endocrinol.* 148, 281-292.
- Singh, M., Su, C., Ng, S. 2013. Non-genomic mechanisms of progesterone action in the brain. *Front Neurosci.* 7, 1-7.
- Skarzynski, D. J., Okuda, K. 2000. Different actions of noradrenaline and nitric oxide on the output of prostaglandins and progesterone in cultured bovine luteal cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 60, 35-47.
- Skarzynski, D. J., Bogacki, M., Kotwica, J. 1999. Involvement of ovarian steroids in basal and oxytocin-stimulated prostaglandin (PG) F<sub>2</sub> $\alpha$  secretion by the bovine endometrium in vitro. *Theriogenology*, 52, 385-397.
- Skarzynski, D. J., Woclawek-Potocka, I., Korzekwa, A., Bah, M. M., Piotrowska, K., Barszczewska, B., Okuda, K. 2007. Infusion of exogenous tumor necrosis factor dose dependently alters the length of the luteal phase in cattle: differential responses to treatment with indomethacin and L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. *Biol. Reprod.* 76, 619-627.

- Slot, K.A., Voorendt, M., de Boer-Brouwer, M., van Vugt, H.H., Teerds, K.J. 2006. Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary. *J. Endocrinol.* 188:179-192
- Smith, M. F., McIntush, E. W., Ricke, W. A., Kojima, F. N., Smith, G. W. 1999. Local cellular and tissue communication-Regulation of ovarian extracellular matrix remodelling by metalloproteinases and their tissue inhibitors: Effects on follicular development, ovulation and luteal function. *J. Reprod. Fertil-Suppl.* 54, 367-384.
- Smith, W. L., DeWitt, D. L., Garavito, R. M. 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual Rev. Biochem.* 69, 145-182.
- Smith, M. F., Ricke, W. A., Bakke, L. J., Dow, M. P., Smith, G. W. 2002. Ovarian tissue remodeling: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191, 45-56.
- Smith, J. T. 2009. Sex steroid control of hypothalamic Kiss1 expression in sheep and rodents: comparative aspects. *Peptides*, 30, 94-102.
- Stacy, B.D., Gemmell, R.T., Thorburn, G.D. 1976. Morphology of the corpus luteum in the sheep during regression induced by prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ . *Biol. Reprod.* 14, 280-291.
- Stocco, D.M., Clark, B.J. 1997. The role of the steroidogenic acute regulatory protein in steroidogenesis. *Steroids* 62:29-36.
- Stocco, C. O., Zhong, L., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Lau, L. F., Gibori, G. 2000. Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ -induced expression of 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase involves the transcription factor NUR77. *J. Biol. Chem.* 275, 37202-37211.
- Stocco, C. O., Lau, L. F., Gibori, G. 2002. A Calcium/Calmodulin-dependent activation of ERK1/2 mediates JunD phosphorylation and induction of nur77 and 20 $\alpha$ -HSD genes by prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  in ovarian cells. *J. Biol. Chem.* 277, 3293-3302.
- Stocco, C. Telleria, C. Gibori, G. 2007. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocrine reviews*, 28, 117-149.
- Stouffer, R.L. 2006 Structure, Function, and Regulation. Chapter 12. Publicado en Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Third Edition, Elsevier, 2006
- Sugino, N. 2006. Roles of reactive oxygen species in the corpus luteum. *Anim. Sci. J.* 77, 556-565.

- Talbott, H., Hou, X., Qiu, F., Zhang, P., Guda, C., Yu, F., Cushman, R.A., Wood, J.R., Wang, C., Cupp, A.S., Davis, J. S. 2017. Early transcriptome responses of the bovine midcycle corpus luteum to prostaglandin F2 $\alpha$  includes cytokine signaling. *Mol. Cel. Endocrinol.* 452, 93-109.
- Talukder, S., Kerrisk, K. L., Gabai, G., Celi, P. 2017. Role of oxidant–antioxidant balance in reproduction of domestic animals. *Anim. Prod. Sci.* 57, 1588-1597.
- Tamanini, C., De Ambrogi, M. 2004. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod. Domest. Anim.* 39, 206-216.
- Terman, B. I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M. E., Dimitrov, D., Armellino, D. C., Gospodarowicz, D., Böhlen, P. 1992. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 1579-1586.
- Tervit, H. R., Rowson, L. E. A., Brand, A. 1973. Synchronization of oestrus in cattle using a prostaglandin F2 $\alpha$  analogue ICI 79939. *J. Reprod. Fertil.* 34, 179-181.
- Thorburn, G. D., Nicol, D. H. 1971. Regression of the ovine corpus luteum after infusion of prostaglandin F2 $\alpha$  into the ovarian artery and uterine vein. *J. Endocrinol.* 51, 785-786.
- Tithof, P. K., Roberts, M. P., Guan, W., Elgayyar, M., Godkin, J. D. 2007. Distinct phospholipase A2 enzymes regulate prostaglandin E2 and F2 $\alpha$  production by bovine endometrial epithelial cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 5, 16.
- , E., Ferreira, J.C., Ackermann, C.L., Destro, F.C., Marques, F.W.C., Souza, C.A., Biehl, M.V., Barros, J., de Figueiredo, P.J.C., Sartori, R., Pinheiro, F.C.J. 2015. Luteal changes after treatment with sub-luteolytic doses of prostaglandin Cloprostenol sodium in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 153, 8-12.
- Tsai, S. J., Wiltbank, M. C. 1997. Prostaglandin F2 $\alpha$  induces expression of prostaglandin G/H synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. *Biol. Reprod.* 57, 1016-1022.
- Tsai, S. J., Wiltbank, M. C. 1998. Prostaglandin F2 $\alpha$  regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. *Biol. Reprod.* 58, 346-352.
- Tsai, S. J., Kot, K., Ginther, O. J., Wiltbank, M. C. 2001. Temporal gene expression in bovine corpora lutea after treatment with PGF2 $\alpha$  based on serial biopsies in vivo. *Reproduction*, 121, 905-913.
- Tsang, P. C. W., Poff, J. P., Boulton, E. P., Condon, W. A. 1995. Four-day-old bovine corpus luteum: progesterone production and identification of matrix metalloproteinase activity in vitro. *Biol. Reprod.* 53, 1160-1168.

- Turzillo, A. M., Juengel, J. L., Nett, T. M. 1995. Pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) increases concentrations of GnRH receptor messenger ribonucleic acid and numbers of GnRH receptors during luteolysis in the ewe. *Biol. Reprod.* 53, 418-423.
- Umo, I. 1975. Effect of prostaglandin F2 $\alpha$  on the ultrastructure and function of sheep corpora lutea. *J. Reprod. Fertil.* 43, 287-292.
- Vega, M., Carrasco, I., Castillo, T., Troncoso, J. L., Videla, L. A., Devoto, L. 1995. Functional luteolysis in response to hydrogen peroxide in human luteal cells. *J. Endocrinol.* 147, 177-182.
- Vonnahme, K. A., Redmer, D. A., Borowczyk, E., Bilski, J. J., Luther, J. S., Johnson, M. L., Reynolds, L.P., Grazul-Bilska, A. T. 2006. Vascular composition, apoptosis, and expression of angiogenic factors in the corpus luteum during prostaglandin F2 $\alpha$ -induced regression in sheep. *Reproduction* 131, 1115-1126.
- Vorontchikhina, M. A., Zimmermann, R. C., Shawber, C. J., Tang, H., Kitajewski, J. 2005. Unique patterns of Notch1, Notch4 and Jagged1 expression in ovarian vessels during folliculogenesis and corpus luteum formation. *Gene Expr. Patterns.* 5, 701-709.
- Vu, T. H., Werb, Z. 2000. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Develop.* 14, 2123-2133.
- Wade, D. E., Lewis, G. S. 1996. Exogenous prostaglandin F2 $\alpha$  stimulates utero-ovarian release of prostaglandin F2 $\alpha$  in sheep: A possible component of the luteolytic mechanism of action of exogenous prostaglandin F2 $\alpha$ . *Dom. Anim. Endocrinol.* 13, 383-398.
- Watanabe, K. 2011. Recent reports about enzymes related to the synthesis of prostaglandin PG F2 PGF2 $\alpha$  and 9 $\alpha$ , 11 $\beta$ -PGF2. *J. Biochem.* 150, 593-596.
- Wathes, D. C., Hamon, M. 1993. Localization of oestradiol, progesterone and oxytocin receptors in the uterus during the oestrous cycle and early pregnancy of the ewe. *Journal of Endocrinology*, 138, 479-491.
- Wathes, D.C., Lamming, G.E. 1995. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Supplement*, 49, 53-67.
- Weems, Y. S., Johnson, D., Uchima, T., Raney, A., Lennon, E., Goto, K., Bowers G., Saldana J., Pang J., Randel RD., Weems, C. W. 2009. Is endothelin-1 luteolytic or antiluteolytic in ewes?. *Prostaglandins Other Lipid, Mediat.* 90, 63-68.
- Weems, Y. S., Arreguin-Arevalo, J. A., Nett, T. M., Vann, R. C., Ford, S. P., Bridges, P. J., Welsh, T.H., Lewisg, A.W., Neuendorffg, D.A., Randelg, R.D., Weems, C. W. 2011. In vivo intra-luteal implants of prostaglandin PG E 1 or E 2 PGE 1, PGE 2 prevent luteolysis in cows. I. Luteal weight, circulating progesterone,

mRNA for luteal luteinizing hormone LH receptor, and occupied and unoccupied luteal receptors for LH. *Prostaglandins Other Lipid, Mediat.* 95, 35-44.

Whisnant, C. S., Goodman, R. L. 1994. Effect of anterior hypothalamic deafferentation on the negative feedback of gonadal steroids on luteinizing hormone pulse frequency in the ewe. *Dom. Anim. Endocrinol.* 11, 151-159.

Wiltbank, M. C. 1994. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. *J. Anim. Sci.* 72, 1873-1883.

Wiltbank, M., Shiao, T., Bergfelt, D., Ginther, O. 1995. Prostaglandin F<sub>2</sub> Receptors in the Early Bovine Corpus Luteum. *Biol. Reprod.* 52, 74-78.

Wiltbank, M.C., Ottobre, J.S. 2003. Regulation of intraluteal production of prostaglandins. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1,91.

Woclawek-Potocka, I., Deptula, K., Bah, M.M., Lee, H.Y., Okuda, K., Skarzynski, D. J. 2004. Effects of nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  on production of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  and E<sub>2</sub> in bovine endometrial cells. *J. Reprod. Dev.* 50, 333-340.

Woods, A., Longley, R. L., Tumova, S., Couchman, J. R. 2000. Syndecan-4 binding to the high affinity heparin-binding domain of fibronectin drives focal adhesion formation in fibroblasts. *Gene Expr. Patterns.* 374, 66-72.

Woodward, D.F., Lawrence, R.A. 1994. Identification of a single FP receptor associated with prostanoid-induced Ca<sup>2+</sup> signals in swiss 3T3 cells. *Biochem. Pharmacol.* 47,1567–1574.

Wright, M. F., Bowdridge, E., McDermott, E. L., Richardson, S., Scheidler, J., Syed, Q., Bush, T., Inskip, E.K., Flores, J.A. 2014. Mechanisms of Intracellular Calcium Homeostasis in Developing and Mature Bovine Corpora Lutea. *Biol. Reprod.* 90, 55, 1–12.

Wu, Y.L., Wiltbank, M.C. 2001. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 gene in ovine large luteal cells. *Biol Reprod.* 65,1565-72.

Xiao, C. W., Goff, A. K. 1999. Hormonal regulation of oestrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells. *J. Reprod. Fertil.* 115, 101-109.

Yadav, V. K., Lakshmi, G., Medhamurthy, R. 2005. Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ -mediated Activation of Apoptotic Signaling Cascades in the Corpus Luteum during Apoptosis involvement of caspase-activated DNase. *J. Biol. Chem.* 280, 10357-10367.

Yoshioka, S., Nishimura, R., Yamamoto, Y., Kimura, K., Okuda, K. 2017. Hypoxia-inducible factor 1 mediates hypoxia-enhanced synthesis of progesterone during luteinization of granulosa cells. *J. Reprod. Dev.* 63, 75-85.

- Zarco, L., Stabenfeldt, G.H., Kindahl, H., Quirke, J.F., Granstrom, E. 1984. Persistence of luteal activity in the non-pregnant ewe. *Anim. Reprod. Sci.* 7, 245-267.
- Zarco, L., Stabenfeldt, G.H., Quirke, J.F., Kindahl, H., Bradford, G.E. 1988a. Release of prostaglandin F<sub>2</sub>- $\alpha$  and the timing of events associated with luteolysis in ewes with oestrous cycles of different lengths. *J. Reprod. Fert.* 83, 517-526.
- Zarco, L., Stabenfeldt, G. H., Basu, S., Bradford, G. E., Kindahl, H. 1988b. Modification of prostaglandin F-2 $\alpha$  synthesis and release in the ewe during the initial establishment of pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 83, 527-536.
- Zelinski, M. B., Noel, P., Weber, D. W., Stormshak, F. 1982. Characterization of cytoplasmic progesterone receptors in the bovine endometrium during proestrus and diestrus. *J. Anim. Sci.* 55, 376-383.
- Zhang, Z., Yin, D., Wang, Z. 2011. Contribution of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  to transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor in bovine developing luteal cells. *Anim. Sci. J.* 82, 244-250.
- Zheng, J., Redmer, D. A., Reynolds, L. P. 1993. Vascular development and heparin-binding growth factors in the bovine corpus luteum at several stages of the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 49, 1177-1189.
- Zingg, H.H.1., Laporte, S.A. 2003. The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* 14:222-227.