

01669  
1  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACION

## FALLA DE ORIGEN

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE LIQUIDO FOLICULAR  
EQUINO SOBRE EL DESARROLLO FOLICULAR, DURACION DE  
LA FASE LUTEA Y FERTILIDAD DE OVEJAS INDUCIDAS A  
OVULAR MEDIANTE LA ADMINISTRACION DE HCG

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN PRODUCCION ANIMAL  
REPRODUCCION

P R E S E N T A :

BALCAZAR SANCHEZ JUAN ALBERTO

ASESORES:

DR. LUISA. ZARCO QUINTERO  
DR. JAVIER VALENCIA MENDEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA MEXICO, D. F., 1995



## **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 está 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.

En un día nos vamos.  
En una noche baja uno a la región  
del misterio:  
Sólo estamos de paso en la tierra.

ANONIMO AZTECA

¿Nada será mi nombre alguna vez?  
¿Nada dejaré en pos de mí en la tierra?  
Al menos flores, al menos cantos.

ANONIMO AZTECA

No tenemos raíces en la tierra,  
no estaremos en ella para siempre  
Sólo un instante breve.  
También se quiebra el jade  
y rompe el oro  
y aún el plumaje de quetzal  
se desgarrá.  
No tenemos la vida para siempre.  
Sólo un instante breve.

En el libro del mundo Dios escribe  
con flores a los hombres  
y con cantos  
les da luz y tiniebla.  
Después os va borrando:  
guerreros, príncipes,  
con tinta negra los revierte a la sombra.

No somos reyes:  
somos figuras en un libro de estampas.

Dios no fincó su hogar en parte alguna.  
Solo en el fondo de un cielo hueco  
está Dios inventando la palabra.

¿Alguien lo vio en la tierra?  
Aquí se hastía,  
no es amigo de nadie  
Todos iremos al lugar del misterio.

De cuatro en cuatro nos iremos muriendo  
muriendo  
aquí sobre la tierra.

Somos como pintura que se borra,  
flores secas, plumajes apagados

Ahora entiendo este misterio  
este enigma.

El poder y la gloria no son nada;  
con el jade y el oro bajaremos  
al lugar de los muertos

De lo que ven mis ojos  
desde el trono  
no quedará ni el polvo en esta tierra.

NEZAHUALCOYOTL

### **RUTINA**

Enero. El mismo camino  
que día tras día inicio; el mismo  
-Hacia lo desconocido-  
Ricardo Magaña

### **ALPINISMO**

Cumbre asida, nuevo abismo;  
más yo escogi este camino  
¿Quejarme? -Andando- Prosigo.  
Ricardo Magaña

## AGRADECIMIENTOS

Nuevamente tengo la oportunidad de expresar mi agradecimiento a mis cómplices en esta nueva aventura que emprendí junto con ellos, y que sin su valiosísima colaboración hubiese sido imposible montar esta obra titulada:

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE LIQUIDO FOLICULAR EQUINO SOBRE EL DESARROLLO FOLICULAR, DURACION DE LA FASE LUTEA Y FERTILIDAD DE OVEJAS INDUCIDAS A OVULAR MEDIANTE LA ADMINISTRACION DE HCG .**

*tragicomedia en dos actos*

Idea original : LUIS ZARCO Q.

Adaptación : ALBERTO BALCAZAR S. Y COMPLICES.

Los personajes que en esta aventura participaron fueron:

### REPARTO

Luis Zarco Q. Asesor y sobretodo cuatacho incondicional.

Javier Valencia M. Asesor y amigo entrañable.

Octavio Mejía (TITO) y Carolina Luyando (CARITO). Cómplices principales en el trabajo y sobre todo en esta tragicomedia que es la vida (los estimo un chingo). Gracias por permitirme girar un poco en la órbita de su mundo, por recordarme que aún tengo capacidad de asombro y que aún en las situaciones más extrañas, bizarras y en los excesos hay un cierto orden.

Eduar Miquelajauregui. Amiguísima del alma incondicional, y que a pesar de la distancia la recuerdo y extraño.

Verónica Caballero (mi Mini), José Luis Cerbón (Chepo), Ramón Mier, Israel Brito (Ungato), Miriam Boeta (La Güera), Verónica Campos (La Berenjena), Carlos Esquivel (El Amarillo), Mariana Bernal (mi Gorda), Fernando y Magda Borderas, Guillermo Montiel (Memorias) amigos y sobretodo pacientes en comprender mis distintos estados de ánimo en las diferentes horas del día.

Ovejas. (Mis Bodoques) Personaje importantísimo sin las cuales no hubiese hecho nada, gracias por aguantarme.

**Dirección de  
TODOS LOS PERSONAJES**

Procesamiento de muestras y líquido folicular, Clara Murcia y Susana Rojas: A ustedes no me resta que expresarles mi más sincera admiración y cariño por su valiosa participación.

Escenografía. CEPIER

Empresa. Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

COMPAÑEROS DE TRABAJO. Antonio Porras, Carlos Galina, Rosa Páramo, Joel Hernández, Adriana Saharrea, Salvador Romo gracias por permitirme compartir alegrías y tristezas con ustedes pero sobre todas las cosas por hacerme sentir que ese pequeño espacio llamado Depto. de Reproducción es mi casa.

Productores . Organismo Internacional de Energía Atómica perteneciente a la FAO-ONU, por los Kits para el procesamiento de las muestras , al CONACYT por la beca proporcionada , a la división de estudios de posgrado de la FMVZ-UNAM, a mi amigo Dr. Rogelio Flores por mostrarme que la buena voluntad y la cooperación aún existen, al laboratorio INTERVET por la donación de la hormona hCG (CHORULON) a todos gracias mil.

Efectos especiales. Arturo Visuet y Martín Sánchez por ser cómplices incondicionales en todos los sentidos y sobre todo por mostrarme que no todo en este escenario es trabajo y que debo de dedicar más tiempo a vivir mi vida.

Diseños. Aurea y Martha. Por dejarme compartir y ser actor en sus vidas, pero más que nada por permitirme conocer ese extraño pero fascinante mundo en el que viven y se mueven.

Utilería. Luis Galicia, mi más profundo agradecimiento por el tiempo invertido en la recolección del LFE.

Estoy consciente que este es un paso, y que faltan muchísimos más para alcanzar la meta propuesta y como escribe mi amigo Ricardo Magaña no debo olvidar lo que él define como:

#### **DOCENCIA**

Bostezos..... Doy sesgo al tema....

!Bravo! la clase despierta.....

(Un zángano que se cuele)

Hay que recordar que a veces el viento enloquece, alza polvo, rompe los cristales o vuela los toldos , pero después de un rato:

#### **LA PAZ, EN EL MANICOMIO...**

Memorias de un habitante del Depto. de Reproducción e IA de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## DEDICATORIA

A MIS PADRES Y HERMANOS POR SU ETERNO CARIÑO Y APOYO

A MIS QUERIDOS SOBRINOS QUE A PESAR DE LAS APARIENCIAS LOS QUIERO MUCHO, Y LES RECUERDO QUE ESTOY CONSCIENTE DE LO QUE REZA EL REFRAN POPULAR: AL HOMBRE QUE DIOS NO LE DA HIJOS (POR EL MOMENTO), EL DIABLO LE DA SOBRINOS.

A TODOS ESOS SERES QUE CON DIVINA PACIENCIA Y CON UN PERFECTO SENTIDO Y CONOCIMIENTO DE LO QUE SIGNIFICA LA PALABRA AMIGO NOS ENTREGAN SU VIDA Y AMOR SIN ESPERAR NADA A CAMBIO MUCHISIMAS GRACIAS POR EXISTIR, ESOS SERES PERFECTOS SON LOS ANIMALES (un recuerdo para mis amigos pasados URSUS, GOLIATH, POPIS y uno para los presentes VANESSA, PELUSA Y LORETA).

A TODO AQUEL QUE SE ATREVA A LEER ESTO.

## INDICE

|              |                                                                                                                                            |    |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>I</b>     | <b>INTRODUCCION</b> .....                                                                                                                  | 1  |
| <b>11</b>    | <b>REVISION DE LITARATURA</b> .....                                                                                                        | 6  |
| <b>2.1</b>   | <b>Desarrollo folicular</b> .....                                                                                                          | 6  |
| <b>2.2</b>   | <b>Formación del cuerpo lúteo</b> .....                                                                                                    | 8  |
| <b>2.3</b>   | <b>Mecanismos asociados a la regresión del cuerpo lúteo</b> .....                                                                          | 9  |
| <b>2.4</b>   | <b>Mecanismos asociados con la formación de un cuerpo lúteo de corta duración</b> .....                                                    | 15 |
| <b>2.4.1</b> | <b>Función de la progesterona como pretratamiento para evitar la formación de un cuerpo lúteo de corta duración</b> .....                  | 15 |
| <b>2.6</b>   | <b>Posibles causas de los cuerpos lúteos de corta duración</b> .....                                                                       | 16 |
| <b>2.6.1</b> | <b>Desarrollo folicular deficiente y aporte luteotrópico</b> .....                                                                         | 16 |
| <b>2.6.2</b> | <b>Liberación anticipada de luteolisinas</b> .....                                                                                         | 17 |
| <b>2.7</b>   | <b>Papel de la inhibina en la regulación de la actividad folicular y la producción de estrógenos</b> .....                                 | 18 |
| <b>2.7.1</b> | <b>Origen y secreción de la inhibina</b> .....                                                                                             | 19 |
| <b>2.7.2</b> | <b>Secreción de la inhibina y el estradiol durante el ciclo estral y mecanismo de inhibición de la hormona FSH</b> .....                   | 20 |
| <b>2.7.3</b> | <b>Efecto del líquido folicular sobre la función ovárica</b> .....                                                                         | 21 |
| <b>III</b>   | <b>MATERIAL Y METODOS</b> .....                                                                                                            | 23 |
| <b>IV</b>    | <b>RESULTADOS</b> .....                                                                                                                    | 26 |
| <b>4.1</b>   | <b>Efecto de la aplicación del líquido folicular equino sobre la fertilidad</b> .....                                                      | 26 |
| <b>4.2</b>   | <b>Concentraciones de progesterona plasmática</b> .....                                                                                    | 26 |
| <b>4.3</b>   | <b>Efecto de la aplicación de líquido folicular equino sobre las concentraciones promedio de progesterona</b> .....                        | 42 |
| <b>4.4</b>   | <b>Efecto de la aplicación de hCG sobre la duración de la primera fase lútea</b> .....                                                     | 46 |
| <b>4.5</b>   | <b>Efecto de la aplicación del líquido folicular equino sobre la luteólisis</b> .....                                                      | 47 |
| <b>4.6</b>   | <b>Efecto de la aplicación del líquido folicular equino sobre las concentraciones de estradiol en folículos</b> .....                      | 47 |
| <b>V</b>     | <b>DISCUSION</b> .....                                                                                                                     | 48 |
| <b>5.1</b>   | <b>Efecto de la aplicación del líquido folicular equino sobre la fertilidad</b> .....                                                      | 48 |
| <b>5.2</b>   | <b>Efecto de la aplicación del líquido folicular equino sobre las concentraciones de progesterona</b> ....                                 | 50 |
| <b>5.3</b>   | <b>Efecto de la aplicación del líquido folicular equino sobre la duración de la primera fase lútea y el momento de la luteólisis</b> ..... | 53 |
| <b>5.4</b>   | <b>Efecto de la aplicación del líquido folicular equino sobre las concentraciones de estradiol</b> .....                                   | 58 |
| <b>VI</b>    | <b>CONCLUSIONES</b> .....                                                                                                                  | 60 |
| <b>VII</b>   | <b>LITERATURA CITADA</b> .....                                                                                                             | 61 |

## RESUMEN

Balcázar Sánchez Juan Alberto. EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE LIQUIDO FOLICULAR EQUINO SOBRE EL DESARROLLO FOLICULAR, DURACION DE LA FASE LÚTEA Y FERTILIDAD DE OVEJAS INDUCIDAS A OVULAR MEDIANTE LA ADMINISTRACION DE HCG . (Asesorado por MVZ. PhD. Luis A Zarco Quintero y MVZ. DMV. Javier Valencia Méndez).

### Experimento 1.

Cincuenta ovejas en anestro estacional (marzo-abril) de diferentes razas, fueron muestreadas para determinar progesterona y así comprobar el estado de anestro. Posteriormente, todas las ovejas fueron inducidas a ovular con 1000 UI de hCG y fueron divididas aleatoriamente en dos grupos experimentales iguales. Las ovejas del grupo experimental fueron tratadas con 3.0 ml de líquido folicular equino libre de hormonas esteroides (LFE), por vía endovenosa cada 8 horas durante 14 días, a partir del tercer día de la aplicación de hCG.

A los animales del grupo testigo se les administraron 3.0 ml de solución salina fisiológica por vía endovenosa cada 8 horas durante 14 días.

A partir del tercer día posterior a la administración de hCG se obtuvieron diariamente muestras de sangre yugular de todas las ovejas durante 19 días, y fueron procesadas para determinar progesterona plasmática.

El 76% de los animales tratados con LFE, presentaron una fase lútea y un cuerpo lúteo de duración normal (CLN) y en algunos casos se alargó por más de 13 días, y sólo un 24% de las ovejas de este grupo formaron un cuerpo lúteo de corta duración (CLCD). En contraste, el 80% de los animales no tratados presentaron una fase lútea de corta duración y sólo el 20% de los animales presentó en esa ovulación una fase lútea de duración normal; la proporción de fases lúteas normales fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) en el grupo tratado con LFE en relación con el grupo no tratado.

En las ovejas tratadas con LFE la duración total de la fase lútea fue de  $10.3 \pm 0.80$  días vs  $4.4 \pm 0.80$  días en las ovejas no tratadas ( $P < 0.01$ ). También se observó que desde el momento de aplicación del LFE en el grupo tratado (día 3 del ciclo estral) las concentraciones de progesterona de estas ovejas fueron significativamente más elevadas que en las ovejas no tratadas aún cuando sólo se tomaron en cuenta los datos de las ovejas que tuvieron cuerpos lúteos de duración normal ( $P < 0.05$ ).

### Experimento 2.

Se utilizaron 18 ovejas que se encontraban ciclando normalmente en época reproductiva. Las ovejas fueron sincronizadas mediante la colocación de esponjas intravaginales durante 12 días. Al retiro de las esponjas se detectó el celo con machos provistos con mandil, considerándose el día del estro como día 0 del ciclo estral.

Posteriormente, al día 10 del ciclo estral las ovejas fueron divididas al azar en dos grupos iguales, las ovejas del grupo experimental fueron tratadas con 3.0 ml de LFE cada 8 horas durante 4 días por vía endovenosa, el grupo testigo recibió 3.0 ml de solución salina fisiológica por vía endovenosa por el mismo tiempo.

Al décimo quinto día todos los animales se les realizó ovariectomía para aspirar el líquido de los folículos mayores de cada oveja. El líquido fue procesado para determinar las concentraciones de 17- $\beta$  estradiol por medio de radioinmunoanálisis.

Las concentraciones de 17- $\beta$  estradiol en las ovejas tratadas con LFE fueron estadísticamente menores que en las del grupo testigo ( $41.20 \pm 87.04$  vs  $303.87 \pm 93.05$  pg/ml respectivamente).

## I. INTRODUCCION

En los rumiantes la duración de la fase lútea depende directamente del momento en el que se establezca un patrón de secreción luteolítico (pulsátil) de prostaglandina  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ) (Zarco *et al.*, 1984, 1988a). Para que se pueda establecer una gestación se requiere que el embrión produzca mensajeros químicos que señalen a la madre su presencia antes de que se inicie la luteólisis (Silvia *et al.*, 1991; Ashworth, 1992), lo que resulta en un patrón no luteolítico de secreción de  $PGF2\alpha$  y la consecuente permanencia del cuerpo lúteo (Zarco *et al.*, 1988b). Existe un intervalo muy corto entre el momento en que el embrión es capaz por primera vez de señalar su presencia a la madre y el momento en que el útero está programado para iniciar la secreción luteolítica de  $PGF2\alpha$  (Ashworth, 1992). Por ésta razón, una de las causas más importantes de infertilidad en rumiantes es la regresión del cuerpo lúteo antes de que el embrión haya tenido tiempo de informar de su presencia a la madre (Hunter, 1991; Garverick *et al.*, 1992a). Esto puede deberse a un retraso en el desarrollo embrionario (Thatcher *et al.*, 1986; Putney *et al.*, 1988), o más comúnmente a un adelanto materno en la liberación de prostaglandina  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ), lo que resulta en la destrucción del cuerpo lúteo antes del reconocimiento materno de la gestación (Hunter, 1991; Garverick *et al.*, 1992b).

En rumiantes en general, y en la oveja en particular, es común que la ovulación sea seguida por la formación de un cuerpo lúteo de corta duración cuando dicha ovulación no ha sido precedida por un período de exposición a progesterona proveniente de un ciclo estral anterior (Hunter, 1991; Garverick *et al.*, 1992a). Así, se presentan fases lúteas cortas antes de la primera ovulación puberal (Rodríguez, 1991; Balcázar, 1992), estacional (Walton, 1977; Oldham y Martin, 1979), o postparto (Braden *et al.*, 1989b), por lo que dichas ovulaciones generalmente son infértiles. También se ha demostrado que la inducción de ovulación utilizando gonadotropina coriónica humana (hCG) o la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en animales prepúberes, resulta en forma repetible en la formación de cuerpos lúteos de corta duración (McLeod *et al.*, 1982a, 1982b; O'Shea *et al.*, 1984; Southee *et al.*, 1988a, 1988b; Driancourt *et al.*, 1990), por lo que éste tratamiento se ha establecido como un

modelo para el estudio de ésta deficiencia lútea y su posible prevención (Hunter, 1991; Garverick *et al.*, 1992a ).

Durante varios años se pensó que era necesaria la presencia de progesterona durante ciertas etapas del desarrollo del folículo destinado a ovular, para que éste madurara adecuadamente y pudiera posteriormente convertirse en un cuerpo lúteo normal (McLeod y Haresing, 1984; Garverick y Smith, 1986; García-Winder *et al.* 1986, 1987). Se pensó entonces que la razón de la formación de un cuerpo lúteo de vida corta era la falta de exposición del folículo en crecimiento a la progesterona proveniente del cuerpo lúteo del ciclo estral previo (Ramírez-Godínez *et al.* , 1981; Hunter *et al.* , 1986; García-Winder *et al.*, 1987; White *et al.*, 1987). Sin embargo, evidencias recientes han demostrado que el cuerpo lúteo de corta duración es intrínsecamente normal (Hunter *et al.*, 1988, Garverick *et al.*, 1992a ), y que su corta vida se debe en realidad a una programación inadecuada de la secreción de prostaglandinas uterinas ( Southee *et al.*, 1988b; Copelin *et al.*, 1989; Hunter *et al.*, 1989; Peter *et al.*, 1989; Cooper *et al.*, 1991). De ésta manera, la falta de exposición uterina a la progesterona durante el ciclo estral previo, resulta en la aparición prematura de receptores para estrógenos y oxitocina (Zollers *et al.*, 1989; Hunter, 1991; Vallet *et al.*, 1991; Zollers *et al.*, 1991; Lau *et al.*, 1992), lo que conduce al establecimiento prematuro de un patrón de secreción luteolítico de PGF2 $\alpha$  (Hunter *et al.*, 1989; Cooper *et al.*, 1991; Zollers *et al.*, 1991).

Por lo anterior, las investigaciones más recientes se han orientado a comprender los mecanismos que regulan el momento en que se inicia la secreción uterina de PGF2 $\alpha$  (Vallet *et al.*, 1991; Silvia *et al.*, 1991; Garverick *et al.*, 1992a; Lau *et al.*, 1992), y a estudiar posibles métodos para retrasar el inicio de dicha secreción. Así, se ha realizado investigación utilizando inhibidores farmacológicos de la síntesis de prostaglandinas, tales como el flunixin-meglumina (Aiumlamai *et al.*, 1990; Odensvik y Gustafsson, 1994) y la indometacina (Troxel y Kesler, 1984). Sin embargo, una desventaja de éste tipo de sustancias es que inhiben la biosíntesis de prostaglandinas a nivel de la enzima ciclooxigenasa, por lo que afectan la síntesis de diversas prostaglandinas en todos los tejidos (Aiumlamai *et al.*, 1990). Esto puede resultar en

interferencia con procesos importantes para el éxito de la gestación, tales como el transporte embrionario y la implantación (Gandolfi *et al.*, 1992).

También se ha intentado inhibir específicamente la secreción pulsátil de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  uterina mediante la utilización de las proteínas trofoblásticas que el propio embrión utiliza para éste fin (Ashworth, 1992; Ott *et al.*, 1992), llamadas proteína trofoblástica ovina-1 (oTP-1) en la oveja (Roberts, 1989; Ashworth, 1992) y proteína trofoblástica bovina (bTP-1) (Thatcher *et al.*, 1989; Geisert *et al.*, 1992). Sin embargo, también se han presentado dificultades debido a que dichas proteínas no se encuentran disponibles en cantidades apreciables, por lo que en su lugar se ha utilizado interferón  $\alpha$ , que es una proteína de la misma familia que oTP-1 y bTP-1 (Leaman y Roberts, 1992; Parkinson *et al.*, 1992). Con el interferón se ha logrado alargar la vida del cuerpo lúteo (Thatcher *et al.*, 1989; Flint *et al.*, 1991; Parkinson *et al.*, 1992; Garverick *et al.*, 1992b), pero debido a sus propiedades pirogénicas se produce una elevación temporal en la temperatura corporal de los animales tratados (Newton *et al.*, 1990; Flint *et al.*, 1991), lo que puede resultar en mortalidad embrionaria y una reducción de la fertilidad (Newton *et al.*, 1990). Además, aún la oTP-1 podría no ser efectiva para alargar la vida de cuerpos lúteos de corta duración, ya que como se mencionó anteriormente en dichos casos hay aparición prematura de receptores uterinos para oxitocina (Hunter, 1991). Se ha demostrado que la oTP-1 es incapaz de inhibir la luteólisis si se administra cuando ya aparecieron los receptores para oxitocina (Bazer *et al.*, 1991; Geisert *et al.*, 1992).

Otra posibilidad para inhibir específicamente la secreción uterina de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  consiste en la supresión de la producción de 17- $\beta$  estradiol por parte de los folículos ováricos en crecimiento, ya que el establecimiento del patrón de secreción pulsátil de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  requiere la aparición de receptores uterinos para oxitocina (McCracken *et al.*, 1984; Hixon *et al.*, 1987; Lutz *et al.*, 1991), los cuales a su vez solamente son sintetizados en presencia de estradiol (McCracken *et al.*, 1984; Hixon *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1992). Adicionalmente, el estradiol de origen folicular estimula en el endometrio la actividad de la enzima fosfolipasa A<sub>2</sub>, necesaria para iniciar la síntesis de prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  (Bazer *et al.*, 1991). Por ésta razón se ha postulado, que parte del efecto antiluteolítico natural de la gestación es mediado a través de

la inhibición de la producción de estrógenos ováricos (Bazer *et al.*, 1991). También se ha postulado que la luteólisis prematura en ovejas tratadas con GnRH antes de la pubertad es debida a una elevación en las concentraciones de estradiol proveniente de una oleada de crecimiento folicular (Hunter, 1991).

En efecto, se ha demostrado que la destrucción mediante cauterización o irradiación de los folículos ováricos presentes durante la fase lútea del ciclo resulta en la prolongación indefinida de la vida del cuerpo lúteo (Karsch *et al.*, 1970; Ginther, 1971). Desafortunadamente, tanto la irradiación como la cauterización de los folículos ováricos son procesos traumáticos, imprácticos e irreversibles. Sin embargo, existe la posibilidad de suprimir fisiológicamente la producción de estradiol folicular sin necesidad de destruir los folículos. Esto puede lograrse mediante la administración de inhibina. Esta hormona es producida por los folículos en crecimiento en respuesta a la hormona folículo estimulante (FSH) y su función es inhibir específicamente la secreción hipofisaria de FSH (Beard *et al.*, 1990; Knight, 1991). La secreción de estradiol por el folículo es dependiente de la FSH, ya que ésta hormona estimula la actividad de la enzima encargada de la aromatización de andrógenos para su conversión en estrógenos en las células de la granulosa (Baird *et al.*, 1991; McNeilly *et al.*, 1991a). De ésta manera, se ha demostrado que la administración de inhibina (Beard *et al.*, 1990), o de fluidos ricos en ella, como el líquido folicular bovino y equino (Robertson *et al.*, 1985; Findlay *et al.*, 1987 ; Gremmes *et al.*, 1990), resulta en importantes reducciones en la secreción de FSH (Findlay *et al.*, 1987; Beard *et al.*, 1990; Baird *et al.*, 1991) y de estradiol folicular (Gremme *et al.*, 1990; Baird *et al.*, 1991). Al reducirse la secreción de estradiol en animales tratados con inhibina podría evitarse la regresión prematura del cuerpo lúteo en animales inducidos a ovular durante la época de anestro.

## **OBJETIVOS**

**Objetivo general-** Evaluar la utilización de líquido folicular equino para prevenir la infertilidad causada por la regresión prematura del cuerpo lúteo, utilizando como modelo a la oveja inducida a ciclar con hCG.

**Objetivos específicos:**

- 1- Evaluar, el efecto de la administración de líquido folicular equino sobre el desarrollo folicular durante la fase lútea posterior a la ovulación inducida con hCG en ovejas en anestro estacional.
- 2- Comparar, a través de determinaciones seriadas de progesterona plasmática, la duración de la fase lútea de ovejas tratadas o no con líquido folicular equino después de ser inducidas a ciclar con hCG.
- 3- Comparar los perfiles de progesterona plasmática durante los primeros 20 días posteriores a la ovulación, en ovejas inseminadas durante la ovulación inducida con hCG y tratadas o no con líquido folicular equino.
- 4- Comparar el índice de concepción a primer servicio en los dos grupos de ovejas descritos en el punto anterior.
- 5- Evaluar el efecto de la administración de líquido folicular equino sobre el desarrollo y función folicular durante la fase lútea de un ciclo estral normal .

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 DESARROLLO FOLICULAR

El desarrollo folicular en la oveja esta controlado principalmente por la secreción de gonadotropinas, hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona lutelinizante (LH), las cuales están bajo el control de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) proveniente del hipotálamo (Hansel y Convey, 1983).

Existe una estrecha interrelación entre la síntesis y liberación de GnRH hipotámico y la secreción de FSH y LH hipofisarias. En el control del ciclo estral también intervienen otras hormonas, algunas de ellas producidas en el ovario, como el estradiol, progesterona, oxitocina y la inhibina. Además de otras producidas en el útero, como la prostaglandina F<sub>2α</sub> (Quirke, 1981).

Las gonadotropinas estimulan el desarrollo folicular (McNeilly *et al* , 1991b). Sin embargo, la secreción de estas hormonas está controlada por mecanismos de retroalimentación tanto positivos como negativos por parte del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Baird *et al* , 1991; McNeilly *et al* , 1991a).

Baird y McNeilly (1981) describen que durante los primeros estadios del desarrollo folicular el requerimiento de gonadotropinas por parte del foliculo es basal, estableciéndose la necesidad de un patrón de secreción pulsátil a medida que el foliculo crece y se desarrolla.

Desde el punto de vista endócrino, el foliculo está compuesto principalmente por dos tipos de células; las de la teca, que presentan receptores para LH y las de la granulosa con receptores para FSH (Driancourt, 1991).

Tanto la LH como la FSH tienen una importante repercusión sobre la actividad esteroideogénica del foliculo , ya que cuando la LH se acopla a su receptor en la célula de la teca se producen una serie de cambios bioquímicos encaminados a sintetizar andrógenos a partir de colesterol. Dichos andrógenos son subsecuentemente convertidos a estradiol en la célula de la granulosa por efecto de un fenómeno de aromatización estimulado por el acople de la FSH a su receptor (McNeilly *et al* , 1991a; Driancourt, 1991) (figura 2.1).

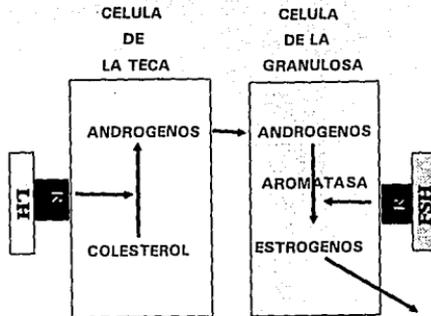


Figura 2.1. Representación esquemática de la actividad esteroidogénica de las células de la teca al sintetizar andrógenos a partir del colesterol y la subsecuente transformación a estradiol en las células de la granulosa.

Receptor (R), Hormona Folículo Estimulante (FSH) y Hormona Luteinizante (LH).

Los estrógenos producidos por el folículo actúan en forma sinérgica con la FSH, estimulando la mitosis en las células de la granulosa, y estimulando la síntesis de receptores para LH en estas células (Scaramuzzi *et al*, 1993).

Recientes investigaciones han demostrado la importancia de la adquisición de receptores para LH por parte de las células de la granulosa, ya que la LH debe actuar sobre estas células para que dejen de inhibir al ovocito. La acción de la LH sobre las células de la granulosa es además indispensable para la maduración y desarrollo final del folículo preovulatorio (McLeod *et al*, 1982a; McNeilly, 1980; McNeilly *et al*, 1991a; Scaramuzzi *et al*, 1993).

El aumento de los niveles de estrógenos provocado tanto por la estimulación de FSH y de LH durante la fase folicular del ciclo, finalmente resulta en la activación de un mecanismo de retroalimentación positiva sobre el eje hipotálamo-hipofisiario, causando una liberación masiva de GnRH, que resulta en la secreción del pico preovulatorio de LH, lo que a su vez desencadena el proceso de ovulación (Short *et al*, 1988).

Después de la ovulación los vasos sanguíneos penetran a través de la membrana basal del folículo y las células de la granulosa comienzan a luteinizarse, sufriendo hiperplasia e hipertrofia, resultando en la formación de un cuerpo hemorrágico (CH) el cual posteriormente se transforma en un cuerpo lúteo (CL). De esta manera las células de la granulosa comienzan a sintetizar progesterona (Austin y Short, 1982).

## 2.2 FORMACION DEL CUERPO LUTEO (CL).

A partir del pico preovulatorio de LH las células de la teca y de la granulosa del folículo ovárico comienzan a sufrir una serie de cambios, tanto morfológicos como bioquímicos, que resultan en el proceso conocido como "luteinización". Este proceso se acelera y se hace más evidente una vez ocurrida la ovulación (Baird, 1992).

Es conocido el hecho de que la LH juega un papel importante en el mantenimiento y funcionalidad del CL. Sin embargo, al inicio del diestro el CL es relativamente independiente del aporte hipofisiario de LH (Baird, 1992).

La interacción de la LH con sus receptores varía dependiendo de la fase del ciclo estral. Después de la ovulación la concentración y número de receptores aumenta paulatinamente, alcanzando su máximo número a la mitad de la fase lútea (Fitz et al., 1982). En esta etapa, la LH se secreta en pulsos de gran amplitud pero con poca frecuencia (Fitz et al., 1982).

El proceso de "luteinización" da como resultado la aparición de dos tipos principales de células en el CL, las células lúteas grandes y las células lúteas chicas, las cuales tienen diferentes características. Las células chicas se originan a partir de la teca folicular, y las células grandes a partir de las células de la granulosa (O'Shea et al., 1984; Wiltbank y Niswender, 1992).

Las células chicas poseen receptores para LH, a la cual responden aumentando la producción de progesterona debido a que al acoplarse a su receptor la LH, estimula la producción de Adenosin Monofosfato cíclico (AMPc), el cual activa una serie de enzimas que transforman el colesterol a progesterona (Baird, 1992; Wiltbank y Niswender, 1992).

Por su parte, las células grandes tienen una gran capacidad para producir progesterona

(más del 80% de la producción total). Sin embargo, esta producción es al parecer autónoma, independiente del aporte de LH o de la vía del AMPC, ( Niswender *et al* , 1985 ; Wiltbank y Niswender, 1992). Además, las células lúteas grandes poseen la capacidad de producir oxitocina.

Al inicio del diestro en la oveja, el CL esta formado principalmente por células lúteas chicas, y gradualmente va aumentando la proporción de células lúteas grandes. Este aumento probablemente se deba a que de alguna manera la LH regula la diferenciación de células chicas a células grandes (Farin *et al* , 1988 ; Donaldson y Hansen, 1965), por lo que se puede concluir que a pesar de que la producción de progesterona por parte de las células grandes no es regulada directamente por la LH, el número de células grandes puede depender en gran parte de esta hormona.

En la oveja, la progesterona producida por el cuerpo lúteo tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la hipófisis (Baird *et al* , 1976) , disminuyendo la liberación de gonadotropinas hipofisarias ( Goodman y Karsch, 1980; Goodman *et al* , 1981). Este efecto se manifiesta a nivel hipofisario como una disminución de la secreción de LH (Hansel y Convey, 1983).

En la oveja no gestante, alrededor del día 14 ó 15 del ciclo estral, se inicia la secreción pulsátil de prostaglandina F<sub>2</sub>α por parte del útero, lo que provoca que la secreción de progesterona lútea decline bruscamente, alcanzando niveles basales menores a 0.2ng/ml en unas cuantas horas (Zarco *et al* , 1988a). A partir de este momento cesa la retroalimentación negativa de la progesterona y por consecuencia aumenta la frecuencia en la secreción y liberación de GnRH, FSH y LH desencadenándose el desarrollo folicular y ocurriendo por consiguiente un aumento en los niveles de estradiol, repitiéndose los eventos fisiológicos para llevar a cabo un nuevo ciclo estral (Karsch *et al* , 1980; Quirke, 1981).

### 2.3 MECANISMOS ASOCIADOS A LA REGRESION DEL CUERPO LUTEO.

Durante la regresión del cuerpo lúteo, se produce inicialmente una disminución en la actividad lútea sin daño celular. Esta luteólisis funcional es inicialmente reversible, pero es seguida poco después por la luteólisis estructural, caracterizada por un daño irreversible sobre

la capacidad del cuerpo lúteo para producir progesterona, por lo que se presenta una drástica disminución en las concentraciones de esta hormona en el suero (Burcher *et al* , 1974; Diekman *et al* , 1978; Niswender *et al* , 1994), seguida por una baja en el peso del CL debida a una disminución en el número de células lúteas (Diekman *et al* , 1978; Braden *et al* , 1988).

Investigaciones recientes señalan que para que se produzca la lisis del CL se requiere que se establezca un patrón de secreción pulsátil de la PGF2 $\alpha$  por parte del útero (Zarco *et al* , 1988a; Kindahl, 1994; Niswender *et al* , 1994). Aunque los mecanismos que regulan la secreción y síntesis de la PGF2 $\alpha$  no estan completamente claros, se conoce que las hormonas esteroides ováricas (estradiol y progesterona ) y la oxitocina (OT), tanto de origen lúteo como hipofisiario, juegan un papel sumamente importante en la generación de estos pulsos (Cooper *et al* , 1991; Silvia *et al* , 1991; Vallet *et al* , 1991; Garverick *et al* , 1992a; Silvia y Raw, 1993).

La prostaglandina F2 $\alpha$ , responsable de la regresión del cuerpo lúteo (MacCracken *et al* , 1981; Poyser, 1984; Wilbank y Niswender, 1992; Niswender *et al* , 1994 ), comienza a secretarse al final de la fase lútea del ciclo estral. Sin embargo, el proceso que regula dicha secreción comienza desde el inicio del ciclo estral, ya que el estradiol proveniente de los folículos ováricos es el responsable de que a nivel uterino se sintetizen receptores para progesterona (Muldoom, 1980); de esta manera una vez que el CL comienza a sintetizar progesterona, el útero comenzará a ser preparado y programado para llevar a cabo los cambios morfológicos y bioquímicos que determinan el inicio de la secreción de PGF2 $\alpha$  y con ello la duración del ciclo estral (Zarco *et al* , 1988b).

Cuando la progesterona se acopla a su receptor en el útero, se producen dos efectos relacionados directamente con la preparación para la luteólisis. Inicialmente, la exposición a progesterona durante la fase lútea promueve la acumulación de las sustancias precursoras necesarias para la síntesis de PGF2 $\alpha$  (ácido araquidónico, gotas de lípidos, enzimas como la sintetasa de prostaglandinas, etc) (McCracken *et al* , 1984; Silvia *et al* , 1991). En segundo lugar, la progesterona ejerce un efecto inhibitorio sobre los receptores de estradiol, causando

su destrucción, lo que evita que se inicie la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  (McCracken *et al* , 1984; Silvia *et al* , 1991; Silvia y Raw, 1993 ).

Por otra parte, la progesterona actúa sobre el eje hipotálamo-hipofisiario produciendo retroalimentación negativa sobre la secreción de gonadotropinas hipofisarias, por lo que durante la mayor parte de la fase lútea no se desarrollan folículos esteroidogénicamente activos, lo que resulta en concentraciones circulantes de estradiol muy reducidas (Baird *et al* , 1976; Hansel y Convey, 1983). Las bajas concentraciones de estradiol circulantes, aunadas al escaso número de receptores para esta hormona presentes en el útero, impiden que el útero sinteticé receptores para oxitocina, ya que para ello se requiere estimulación estrogénica ( Flint *et al* , 1986; Zhang *et al* , 1992; Lau *et al* , 1993; Beard *et al* , 1994).

Para que el útero pueda responder a la oxitocina secretando  $\text{PGF2}\alpha$  debe de haber estado expuesto a progesterona por lo menos 10 a 12 días (Vallet *et al* ,1991; Lamming *et al* , 1991; Lau *et al* , 1992) ya que después de ese tiempo la progesterona provoca la destrucción de sus propios receptores en útero (McCracken *et al* , 1984), lo que permite que disminuya el efecto negativo de la progesterona sobre el útero, con lo que reaparecen receptores para estradiol (McCracken *et al* , 1984). El estradiol proveniente de los folículos (Baird *et al* , 1976; Silvia *et al* , 1992), al interactuar con sus receptores estimula la síntesis de receptores para oxitocina (McCracken *et al* , 1984; Silvia *et al* , 1991).

En este momento se comienza a liberar oxitocina de origen hipofisiario en una forma pulsátil (Silvia *et al* , 1991). La interacción de esta oxitocina con su receptor ocasiona la liberación de  $\text{PGF2}\alpha$  uterina ( McCracken *et al* , 1984; Silvia *et al* , 1991 ). Las elevadas concentraciones de  $\text{PGF2}\alpha$  a su vez estimulan al CL para que este libere más oxitocina (Moore *et al* ,1986; Wathes y Kendall, 1992; Beard y Lamming, 1994 ) de esta manera, la oxitocina tanto de origen hipofisiario como lúteo interactúa con sus receptores, desencadenándose la liberación de más  $\text{PGF2}\alpha$  (McCracken *et al* , 1984; Baird, 1992), estableciéndose entonces un ciclo de retroalimentación positiva entre estas dos hormonas. Sin embargo, este ciclo de alguna manera es autolimitante debido a que los receptores para oxitocina son destruidos una vez utilizados, por lo que el útero deja de liberar  $\text{PGF2}\alpha$  después de ser estimulado. McCracken

et al .(1984) mencionan que se requieren alrededor de 6 horas para que se vuelvan a sintetizar receptores para oxitocina, por lo que el siguiente pulso de  $\text{PGF2}\alpha$  ocurre después de ese tiempo, iniciándose de esta manera el modelo de secreción pulsátil de  $\text{PGF2}\alpha$  (Zarco et al , 1988b ; Hunter, 1991 ) responsable de que el cuerpo lúteo sufra lisis ( en la figura 2.3.1 se esquematizan de una manera simplificada los eventos que ocasionan la lisis lútea).

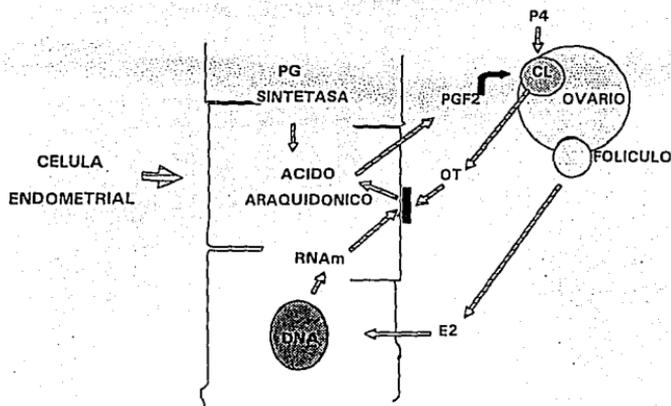
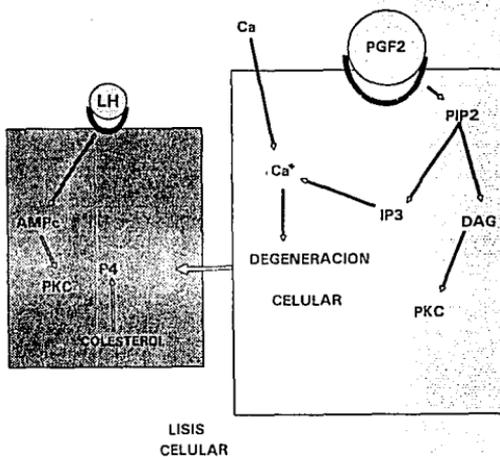


Figura 2.3.1. Representación esquemática del diálogo que se establece entre las diferentes estructuras y hormonas que intervienen en el proceso de lisis del cuerpo lúteo. Donde se observa que el folículo produce estrógenos (E2), los cuales en la célula endometrial ocasionan la síntesis de receptores para oxitocina (barra sólida); posteriormente el cuerpo lúteo (CL) también produce oxitocina (OT) la cual al acoplarse a su receptor en la célula endometrial estimula la producción de enzimas (sintetasa de prostaglandinas), que transforman el ácido araquidónico a Prostaglandina  $\text{F2}\alpha$  ( $\text{PGF2}\alpha$ ) y esta ocasiona la lisis del cuerpo lúteo, además de provocar más liberación de oxitocina.

A medida que se desarrollan estos eventos, la secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo comienza a disminuir por acción de la  $\text{PGF2}\alpha$  ( Baird *et al* , 1976; Zarco *et al* , 1988a; Zhang *et al* , 1991 ).

La degeneración de las células lúteas provocada por la  $\text{PGF2}\alpha$  al parecer se inicia con una marcada disminución en el aporte sanguíneo (Braden *et al* , 1988; Wiltbank y Niswender, 1992). Posteriormente, al unirse la  $\text{PGF2}\alpha$  a sus receptores en las células grandes del cuerpo lúteo, induce una activación de la fosfolipasa C, la cual causa hidrólisis de la membrana, activando al fosfatidylinositol 1,5-bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ) , inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) y al 1,2-diacilglicerol (DAG) el cual incrementa la actividad de la Protein Kinasa C (PKC), calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) y al  $\text{IP}_3$ , liberando calcio intracelular y resultando en la acumulación de este elemento, lo cual causa un deterioro de estas células. Las células chicas del cuerpo lúteo no tienen receptores para  $\text{PGF2}\alpha$ . Sin embargo, bajo los efectos de esta hormona las células grandes producen factores citotóxicos para las células chicas; además la activación de la PKC en las células chicas inhibe la producción de progesterona en respuesta a la LH (Hoyer, 1989; Hansel *et al* , 1991; Wiltbank y Niswender, 1992 ) (figura 2.3.2.).



Adaptado Baird *et al* , 1992.

Figura 2.3.2. Representación esquemática de la degeneración de las células grandes y chicas de la CL. En donde se observa que hay una entrada de calcio (Ca) al interior de la célula lútea grande, la prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2</sub>) al acoplarse a su receptor, activa al fosfatidylinositol 1,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y al 1,2-dia-cyglycerol (DAG) el cual incrementa la actividad de la Protein Kinasa C (PKC), calcio (Ca<sup>++</sup>) y al IP<sub>3</sub> liberando calcio (Ca<sup>++</sup>) intracelular, resultando en una acumulación de este elemento, lo cual causa deterioro de estas células, las cuales a su vez producen factores citotóxicos para las células chicas.

## 2.4 MECANISMOS ASOCIADOS CON LA FORMACION DE UN CUERPO LUTEO DE CORTA DURACION

Como ya se mencionó, en un ciclo estral normal, después del desarrollo folicular sobreviene la ovulación con la subsecuente aparición de un CL de vida media normal. Sin embargo, es reconocido que en diferentes etapas de la vida reproductiva de las ovejas hay la formación de un cuerpo lúteo cuya vida funcional es muy corta (3 a 6 días) y con una baja producción de progesterona. Así, se presentan fases lúteas cortas antes de la primera ovulación puberal (Rodríguez, 1991; Balcázar, 1992), estacional (Walton *et al.*, 1977; Oldham y Martin, 1979) o postparto (Braden *et al.*, 1989a), por lo que dichas ovulaciones generalmente son infértiles. También se ha demostrado que la inducción de la ovulación utilizando gonadotropina coriónica humana (hCG) o con la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) en animales anéstricos, induce en forma repetible la formación de cuerpos lúteos de corta duración (McLeod *et al.*, 1982a, 1982b; MacLeod y Haresing, 1984; O'Shea *et al.*, 1984; Copelin *et al.*, 1987; Southee *et al.*, 1988a, 1988b; Driancourt *et al.*, 1990).

Para estudiar esta disfunción se ha utilizado como modelo el CI que se forma después de la primera ovulación inducida en época no reproductiva (MacLeod *et al.*, 1982a; MacLeod y Haresing, 1984). Sin embargo, también se ha observado que el cuerpo lúteo inducido tiene una funcionalidad normal cuando se realiza un pretratamiento con progestágenos antes de inducir la ovulación (McLeod *et al.*, 1982a; McLeod y Haresing, 1984; Hunter *et al.*, 1986; Hunter y Southee, 1987; Keisler y Keisler, 1989).

### 2.4.1 *Función de la progesterona como pretratamiento para evitar la formación de un cuerpo lúteo de corta duración*

La manera en que un pretratamiento con progesterona provoca que después de la inducción de la ovulación se desarrolle un cuerpo lúteo de funcionalidad normal no está del todo claro.

Hunter *et al.*, (1986) mencionan que el pretratamiento con progesterona modula la frecuencia y la amplitud de los pulsos de LH, con lo que se afecta en forma determinante el

desarrollo de los folículos considerados como preovulatorios (mayores de 4mm de diámetro y que producen más de de 100ng/ml de estradiol)(McNeilly *et al*, 1980).

Keisler y Keisler (1989), mencionan que en los folículos considerados como no ovulatorios el pretratamiento con progestágenos suprime su desarrollo, lo que resulta en una disminución en el número de las células de la granulosa (Hunter *et al* , 1986), reducción de los niveles de estradiol en el líquido folicular, y con un aumento en las concentraciones de testosterona. Sin embargo, el número de receptores para LH no varía, lo cual hace suponer que la reducción en las concentraciones de estradiol no es debida a una carencia de su precursor (andrógenos), por lo que posiblemente el pretratamiento a base de progestágenos en ovejas inducidas a ovular actúa directamente inhibiendo la enzima que aromatiza los andrógenos a estradiol (Hunter *et al* , 1986; Hunter y Souhee, 1987; Hunter, 1989).

Otro efecto del pretratamiento a base de progestágenos, es que a nivel uterino las concentraciones de receptores para oxitocina son menores que en las ovejas no pretratadas (Hunter *et al* , 1989; Vallet *et al* , 1990; Lau *et al* , 1993).

## 2.6 POSIBLES CAUSAS DE LOS CUERPOS LUTEOS DE CORTA DURACION.

Hunter (1991) menciona, que los mecanismos asociados con la subnormal función lútea pueden deberse a: Un deficiente desarrollo folicular preovulatorio, aporte luteotrópico inadecuado o una liberación prematura de luteolisinas.

### 2.6.1 *Desarrollo folicular deficiente y aporte luteotrópico inadecuado*

En sus respectivas revisiones bibliográficas, Hunter (1991) y Garverick y Smith (1986) mencionan, que diversos autores han sugerido que la formación de cuerpos lúteos de corta duración son el resultado de un inadecuado desarrollo folicular, postulándose que una estimulación inadecuada de las células foliculares por las gonadotropinas podría evitar que en estas células se desarrolle la habilidad para la producción de progesterona. Aunque hay varios trabajos al respecto, los resultados encontrados son contradictorios; ya que Ramírez- Godínez *et al* (1981) mencionan, que las concentraciones de FSH disminuyen y que las de LH no sufren variaciones en animales que presentaron fases lúteas cortas. Sin embargo, García-Winder *et al* , (1986) informan que los pulsos de LH disminuyen y que los de FSH no varían.

El número de receptores para LH en las células de la granulosa y teca son menores en ovejas que presentan fases lúteas cortas ( Hunter *et al.*, 1988). Sin embargo, se ha observado que una disminución en la secreción de LH durante la fase lútea temprana, no afecta la funcionalidad lútea.

#### 2.6.2 Liberación anticipada de luteolisin

Investigaciones recientes, indican que el cuerpo lúteo de corta duración es intrínsecamente normal y que su corta vida funcional no depende de él, sino que es debida a una prematura liberación de  $\text{PGF2}\alpha$  por parte del útero ( Southee *et al.*, 1988b; Copelin *et al.*, 1989; Hunter *et al.*, 1989; Peter *et al.*, 1989; Cooper *et al.*, 1991; Garverik *et al.*, 1992a ).

Es conocido el hecho que la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  es prematura en ciclos estrales de corta duración. Probablemente esto sea debido a que entre los días 3 y 5 , en ovejas con cuerpos lúteos de vida corta, hay elevaciones pulsátiles de oxitocina (Hunter, 1991).

Otra evidencia que hace suponer que la corta vida funcional del cuerpo lúteo es debida a una liberación anticipada de  $\text{PGF2}\alpha$  es el hecho que en ovejas en anestro estacional inducidas a ovular con GnRH , gonadotropina del suero de la yegua gestante (eCG) o gonadotropina coriónica humana (hCG), pretratadas o no con progestágenos sintéticos e histerectomizadas o no se observó que las ovejas histerectomizadas desarrollaban un cuerpo lúteo de vida funcional normal a pesar de no haber sido pretratadas con progestágenos ( Keisler *et al.*, 1983; Southee *et al.*, 1988a; Hu *et al.*, 1991; Hunter, 1991 ). Esto indica que al suprimir la fuente de  $\text{PGF2}\alpha$  (útero), el cuerpo lúteo es capaz de mantener su función indefinidamente, lo que no sería posible si tuviera un defecto intrínseco.

Hunter (1991), ha postulado la hipótesis de que en animales inducidos a ovular y que no han sido pretratadas con progestágenos, las concentraciones relativamente bajas de estradiol producidas por lo pequeños folículos presentes en este tipo de animales (Carson *et al.*, 1981; Tsonis *et al.*, 1984), pueden ser suficientes para desencadenar la secreción prematura de  $\text{PGF2}\alpha$ .

Por lo anterior, las actuales investigaciones se han orientado a comprender los

mecanismos que regulan el momento en que se inicia la secreción uterina de PGF2 alfa (PGF2 $\alpha$ ) en animales con ciclos estrales de corta duración. Varios de estos estudios se han orientado a entender el papel de los estrógenos foliculares en la regulación de la aparición de receptores uterinos para oxitocina (Vallet *et al.*, 1991; Silvia *et al.*, 1991; Garverick *et al.*, 1992a; Lau *et al.*, 1992).

## 2.7 PAPEL DE LA INHIBINA EN LA REGULACION DE LA ACTIVIDAD FOLICULAR Y LA PRODUCCION DE ESTROGENOS.

En la oveja la FSH y LH son necesarias para el crecimiento y desarrollo de folículos antrales (McNeilly *et al.*, 1991a). La FSH estimula el crecimiento, la mitosis y la completa diferenciación de las células de la granulosa para que adquieran receptores a LH y desarrollen su máxima capacidad aromatizante para producir estradiol, además de estimular la secreción de inhibina (Henderson *et al.*, 1984; Baird *et al.*, 1991) (ver capítulo 2.1). A su vez, el estradiol y la inhibina, controlan la secreción de FSH mediante mecanismos de retroalimentación negativa (Campbell *et al.*, 1990; Mann *et al.*, 1990; Mann *et al.*, 1992a, 1992b).

La inhibina es una hormona glicoprotéica compuesta por dos subunidades, una  $\alpha$  y una  $\beta$ , unidas por un puente disulfuro (Burger, 1988). Investigaciones recientes (Kretser y Robertson, 1989; Knight, 1991; De Jong, 1987), han demostrado que hay variaciones en la estructura molecular (cambio en la secuencia de amino ácidos) en la subunidad  $\beta$  de esta hormona, ya que se han aislado formas denominadas  $\beta A$  y  $\beta B$ . En el líquido folicular se han observado secuencias de aminoácidos que corresponden a lo que podrían ser la subunidad alfa y a la beta de la inhibina. De Jong, (1987) describió que estas dos subunidades son sintetizadas en forma de prehormonas, las cuales son biológicamente inactivas al estar aisladas, pero que una vez unidas a la otra prehormona constituyen la forma biológicamente activa de la inhibina (Robertson *et al.*, 1990).

### 2.7.1 Origen y secreción de la inhibina.

En la oveja, como en las otras hembras domésticas, se ha observado que en líquido folicular hay grandes cantidades de inhibina (Findlay *et al* , 1986; Hamada *et al* , 1989).

Investigaciones anteriores sugerían que el cuerpo lúteo de la oveja también producía inhibina. Esta conclusión se basaba en experimentos en los cuales se había encontrado inhibina biológicamente activa en ovarios que contenían 1 ó más cuerpos lúteos. Sin embargo, al realizarse los experimentos para comprobar esta hipótesis se utilizaron animales que habían sido tratados contra androstenediona, por lo que presentaban altas poblaciones de folículos antrales, además de tener cuerpos lúteos, por lo que la sugerencia de un origen lúteo fue debida a fallas en el diseño del experimento (Baird *et al* , 1991).

Actualmente, se conoce que las células de la granulosa de los folículos antrales son las que producen inhibina. Aunque generalmente se ha considerado que la producción de inhibina es estimulada por la hormona FSH a través de AMPC, recientemente se ha sugerido que la LH tiene un papel importante en este proceso (Bicsak *et al* , 1986; Rivier *et al* , 1989), además que el RNAm de la subunidad alfa es expresado en las células de la granulosa de folículos antrales (Findlay *et al* , 1989; Campbell *et al* , 1990; Mann *et al* , 1992a y 1992b; Roser *et al* , 1994). La principal fuente de inhibina son los folículos antrales grandes, considerados "esteroidogénicos" , los cuales producen alrededor del 55% de la producción total. Sin embargo, los folículos medianos y pequeños, considerados como "no esteroidogénicos" contribuyen con el 45% restante de la producción de inhibina (Hage *et al* , 1978; DeWolff, 1982; Tsonis *et al* , 1983; Baird *et al* , 1991; Mann *et al* , 1992a).

### 2.7.2 *Secreción de la inhibina y el estradiol durante el ciclo estral y mecanismo de inhibición de la hormona FSH.*

Al igual que otras hormonas, la inhibina y el estradiol se secretan en forma pulsátil (Martin *et al* , 1988; McNeilly y Baird. 1989b; McNeilly *et al* , 1989a; Findlay *et al* , 1991).

El estradiol se deriva principalmente de folículos "estrogénicos" grandes (Baird *et al* , 1991) aunque los pequeños folículos "no estrogénicos" llegan a producir pequeñas cantidades de estradiol, ( Carson *et al*,1981). Las concentraciones de este esteroide varían dependiendo de la fase del ciclo estral en la que se encuentre la oveja. Durante la fase lútea la secreción de estradiol fluctúa considerablemente día con día; esta variación se debe en primer lugar a las fluctuaciones en las concentraciones de LH (Baird y McNeilly, 1981). En segundo lugar, una gran parte (cerca del 40%) del estradiol secretado por el ovario se deriva de folículos antrales grandes (Baird *et al* , 1991; Mann *et al* , 1992a), los cuales varían en número durante toda la fase lútea. De esta manera , se ha observado que durante el diestro hay "ondas" de desarrollo folicular, las cuales ocurren a intervalos de 4 días (Baird *et al* , 1991; Mann *et al* , 1992a).

Cuando las concentraciones de progesterona declinan por efecto de la luteólisis, las pulsaciones de LH aumentan su frecuencia, estimulando la secreción de androstenediona, la cual es transformada en estradiol por las células de la granulosa. De esta manera, el estradiol ocasiona una retroalimentación positiva para que ocurra el pico preovulatorio de LH (Baird *et al* , 1991). Se ha observado que 24 horas después del pico preovulatorio de LH hay una segunda elevación de FSH que coincide con una disminución en los niveles de estradiol y de androstenediona. Esto probablemente se debe a que en este momento las células de la teca están desensibilizadas, impidiendo que se realice la retroalimentación negativa sobre la FSH (Baird *et al* , 1981; Webb y England citados por Baird *et al* , 1991).

La secreción de inhibina varía mucho menos que la del estradiol durante el ciclo estral. Durante la fase lútea hay dos elevaciones en la secreción de inhibina producida por grandes folículos estrogénicos que se desarrollan durante la fase lútea y que tendrían la capacidad de ovular si en ese momento se lisara el cuerpo lúteo. Sin embargo, al no producirse esa

regresión, los folículos sufren atresia ( Campbell *et al* , 1990; Baird *et al* , 1991).

Taya *et al* , (1991) mencionan que la inhibina y el estradiol actúan de manera sinérgica sobre la hipófisis anterior para causar una supresión en la secreción de FSH. En contraste, la inhibina por sí sola inhibe la secreción en hipófisis y disminuye la producción de RNAm para la subunidad  $\beta$  de la FSH, causando un decremento en las concentraciones circulantes de FSH (De Jono, 1987; Findlay *et al* , 1991).

### 2.7.3 Efecto del líquido folicular sobre la función ovárica.

El líquido folicular de las diferentes hembras domésticas contiene grandes cantidades de inhibina, la cual al parecer guarda cierta homología entre especies ( Hamada *et al* , 1989; De Jono , 1991; Knight, 1991). Además de la inhibina, se ha informado que el líquido folicular contiene componentes no esteroideos como la activina, la cual es una hormona parecida a la inhibina que tiene la función de estimular la secreción de FSH . El líquido folicular también contiene folistatina, la cual está relacionada también con una inhibición sobre la secreción de FSH , pero no está formada por fragmentos de inhibina . Además el líquido folicular contiene otros componentes relacionados con otras funciones del ovario ( Sato *et al* , 1982; Henderson *et al* , 1986; Robertson *et al* , 1990; Findlay *et al* , 1991; Knight, 1991 ; De Jono ,1987).

Dado que el líquido folicular de las diferentes hembras domésticas contiene grandes cantidades de inhibina biológicamente activa, en vacas y ovejas se ha utilizado líquido folicular ovino, equino , bovino y porcino libre de esteroides para reducir la secreción de FSH y así retardar el inicio del estro (Henderson *et al* , 1986; Quirke y Fortune, 1986 ; Baird *et al* , 1990; McNeilly *et al* , 1991b).

El principal efecto del líquido folicular es reducir las concentraciones plasmáticas de FSH, y este evento se le ha atribuido a la inhibina. Sin embargo, el efecto depende de la dosis del líquido folicular que está recibiendo la hembra, ya que se ha observado que en la oveja la aplicación de líquido folicular bovino en cantidades menores a 1.0 ml cada 8 ó 12 horas no

produce ningún efecto, mientras que las dosis de 3 a 5 ml cada 8 hrs son capaces de inhibir la secreción de FSH, y por lo tanto el desarrollo folicular (Henderson *et al* , 1986; Martin *et al* , 1987; Knight *et al* , 1991; Miquelajauregui, 1993).

Diversos autores han observado que mientras se aplique el líquido folicular libre de hormonas esteroides se pueden inhibir las concentraciones de FSH, y que si este se aplica durante el período preovulatorio se puede retrasar la ovulación y el estro, debido a que el líquido folicular retrasa el desarrollo folicular en estos animales. También se ha observado que los folículos de animales tratados con líquido folicular, presentan una menor cantidad de células de la granulosa, y su capacidad para aromatizar hormonas esteroides se encuentra reducida (Miller *et al* , 1979a y 1979b; Henderson *et al* , 1986; Medhamurthy *et al* , 1987).

En equinos se ha comprobado que los folículos de la yegua producen grandes cantidades de inhibina biológicamente activa, y se ha demostrado que el líquido folicular equino libre de esteroides suprime las concentraciones de FSH circulante, y por consiguiente es capaz de inhibir el desarrollo folicular (Miller *et al* , 1979a; Bergfelt y Ginther, 1985).

En estudios preliminares del Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (Miquelajauregui, 1993, ) se ha logrado alargar la vida del cuerpo lúteo de ovejas que se encuentran ciclando normalmente, administrando para ello líquido folicular bovino durante la fase lútea tardía. Sin embargo, nunca se ha utilizado líquido folicular equino para alargar la vida de un cuerpo lúteo destinado a tener corta duración en ovejas en anestro estacional inducidas a ovular mediante la administración de hCG, ni se ha evaluado si éste tratamiento podría resultar en el establecimiento exitoso de la gestación en ovulaciones inducidas que de otra manera serían infértiles.

### III. MATERIAL Y METODOS

Este trabajo se realizó en el Centro de Enseñanza Práctica, Investigación y Extensión en Rumiantes (C.E.P.I.E.R), y en el Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El C.E.P.I.E.R está ubicado en el km 29 de la Carretera Federal México Cuernavaca, delegación de Tlalpan, D.F. a 2760 msnm, 19° 3' latitud norte y 99° 8' longitud oeste. El clima de la región es de tipo c(w) b (ij), que corresponde a semifrío semihúmedo, con lluvias en verano y una precipitación pluvial de 800 a 1200 milímetros anuales.

#### 3.1 Obtención y procesamiento del líquido folicular equino

El líquido folicular equino (LFE) utilizado en el grupo experimental se obtuvo con jeringa insulínica a partir de folículos menores a 3.5 cm de diámetro presentes en ovarios de yeguas colectados en un rastro local. El líquido fue colocado en frascos con tapón de rosca, los cuales se colocaron en hielo para su posterior transporte al laboratorio. Todo el líquido folicular recolectado se mezcló y se sometió a centrifugación a 2,500 rpm durante 15 minutos a 4° C, y el sobrenadante se guardó a -20° C. Al descongelarlo se le añadió carbón vegetal activado (5mg/ml) con el objeto de remover los esteroides presentes en el líquido folicular. Se homogenizó la solución durante 4 horas a 4° C. El carbón activado se retiró mediante centrifugación (3,000 rpm) durante 30 minutos a 4° C y después se filtró el líquido (Whatman No. 1). Posteriormente se le añadió penicilina G sódica (100 UI/ml) para evitar la contaminación microbiana. El líquido folicular equino libre de esteroides se guardó a -20° C hasta ser descongelado antes de inyectarlo (Knight y Castillo, 1988; Gremmes *et al*, 1990).

#### Experimento 1.

Se utilizaron 50 ovejas en anestro estacional (marzo-abril). Para comprobar el estado de anestro se observaron calores con la ayuda de machos celadores provistos con mandil durante un período de 18 días antes de iniciar el experimento, y se ratificó mediante la determinación de niveles de progesterona en el plasma dos veces a la semana durante los mismos 18 días.

Las cincuenta ovejas fueron inducidas a ovular mediante la administración

intramuscular de 1000 UI de hCG (dosis única) (Driancourt *et al.*, 1990). Posteriormente, las ovejas fueron divididas aleatoriamente en dos grupos iguales. Las ovejas del grupo experimental fueron tratadas cada 8 horas durante 14 días con 3.0 ml de líquido folicular equino administrado por vía endovenosa, comenzando 3 días después de la inyección de hCG. A los animales del grupo testigo se les administró 3.0 ml de solución salina fisiológica por vía endovenosa cada 8 hrs durante 14 días. Diez ovejas de cada grupo experimental fueron inseminadas artificialmente (Quispe, 1989) 24 y 48 horas después de recibir la inyección de hCG.

A partir del tercer día posterior a la administración de hCG se obtuvieron diariamente durante 19 días muestras de sangre yugular de todas las ovejas, que fueron procesadas para separar el plasma y determinar las concentraciones de progesterona mediante los métodos descritos por Pulido *et al.* (1991). Se calcularon las concentraciones promedio de progesterona para cada uno de los días del ciclo, las cuales se compararon mediante un análisis de varianza para mediciones repetidas, utilizando como factores el tratamiento (experimental o testigo) y el día del ciclo (1 a 19), con el efecto de animal anidado dentro de tratamiento (Gutierrez, 1992). Se determinó el momento en que se inició y terminó la luteólisis mediante el método descrito por Zarco *et al.* (1988a). A partir de ese dato se calculó la duración de la fase lútea de cada animal, realizándose comparaciones mediante la prueba de "t" de Student.

En las ovejas inseminadas se realizó el diagnóstico de gestación mediante la determinación de las concentraciones de progesterona en el día 19 postservicio (Flores *et al.*, 1992) y se confirmó el diagnóstico de gestación con ultrasonido en el día 60, comparándose los dos grupos mediante la prueba de Chi-cuadrada.

La duración de la fase lútea fue determinada por el método descrito por Rodríguez, (1991).

Se consideró una fase lútea normal a aquellas elevaciones de progesterona que se mantenían por encima de 1 ng/ml por 9 días o más.

Se consideró como una fase lútea corta a aquellas en las que las concentraciones de

progesterona se elevan por encima de 0.5 ng/ml pero no llegaron a rebasar 1ng /ml, o solamente lo hicieron durante períodos de 8 días o menos.

#### Experimento 2.

Se utilizaron 18 ovejas que se encontraban ciclando normalmente en la época reproductiva. Las ovejas fueron sincronizadas mediante la colocación de esponjas intravaginales impregnadas con 40 mg acetato de fluorogestrona (FGA) durante 12 días. Posteriormente se retiró el progestágeno y se procedió a detectar el celo con machos provistos con mandil. El momento de la detección del celo se consideró como el día 0 del ciclo estral. Posteriormente, en el día 10 del ciclo estral las ovejas fueron divididas aleatoriamente en dos grupos iguales. Las ovejas del grupo experimental fueron tratadas cada 8 horas durante 4 días con 3.0 ml de líquido folicular equino administrado por vía endovenosa. A los animales del grupo testigo se les administraron 3.0 ml de solución salina fisiológica por vía endovenosa cada 8 hrs durante 4 días. En el día décimo cuarto del ciclo estral se suspendió el tratamiento con líquido folicular equino (LFE). Para evaluar el efecto de la administración de líquido folicular equino sobre el desarrollo y función folicular, al siguiente día (décimo quinto) se procedió a realizar la ovariectomía a los 18 animales, para proceder a aspirar el líquido folicular de los tres folículos mayores de cada oveja. El líquido fue almacenado en frascos de vidrio y se congeló para su posterior procesamiento y determinar las concentraciones de 17- $\beta$  estradiol, utilizando la técnica de radioinmunoanálisis (Baird *et al*, 1976). Se utilizó la prueba de t de student para comparar entre grupos experimentales las concentraciones promedio de estradiol en el líquido folicular de todos los folículos aspirados, y en el líquido del folículo mayor de cada oveja.

## IV RESULTADOS

### 4.1 Efecto de la aplicación del líquido folicular equino sobre la fertilidad

Ninguna de las ovejas inseminadas ( $n=20$ ) en ambos grupos quedo gestante. Por esta razón, y debido a que las concentraciones de progesterona en las ovejas inseminadas se comportaron en forma estadísticamente similar a las de las ovejas no inseminadas del grupo correspondiente (con o sin líquido folicular), se decidió juntar los resultados de progesterona de ovejas inseminadas y no inseminadas, para realizar el análisis estadístico final solamente con respecto a la aplicación o no de líquido folicular.

### 4.2 Concentraciones de progesterona plasmática

En el grupo no tratado con LFE el 80% de los animales ( $n=20$ ) presentaron después de la inducción de la ovulación con hCG una fase lútea corta o un cuerpo lúteo de corta duración (figuras 1 a 6), y solo el 20 % de los animales ( $n=5$ ) presentaron en esa ovulación una fase lútea de duración normal (figuras 7 y 8). En contraste, en el grupo tratado con LFE se observó que en el 76 % de las ovejas ( $n=19$ ), la primera fase lútea tuvo una vida media normal (figuras 9 a 13) y en algunos casos esta fase lútea se alargó por más de 13 días, y solo un 24 % ( $n=6$ ) de las ovejas del grupo formaron un cuerpo lúteo de corta duración (figura 14 y 15). La proporción de fases lúteas normales fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en el grupo tratado con LFE en relación con el grupo no tratado.

Cabe hacer mención que un 48% ( $n=12$ ) de los animales que no fueron tratados con LFE y 4% ( $n=1$ ) de las ovejas tratadas tuvieron la oportunidad de presentar una segunda ovulación durante el periodo de 19 días de muestreo. La segunda fase lútea tuvo una duración promedio de 9.14 días. Esta marcada diferencia entre los grupos se debió a que en el grupo tratado con LFE si se mantuvo el cuerpo lúteo de la primera ovulación, por lo que los animales no tuvieron tiempo de tener una segunda ovulación y fase lútea durante el periodo de muestreo.

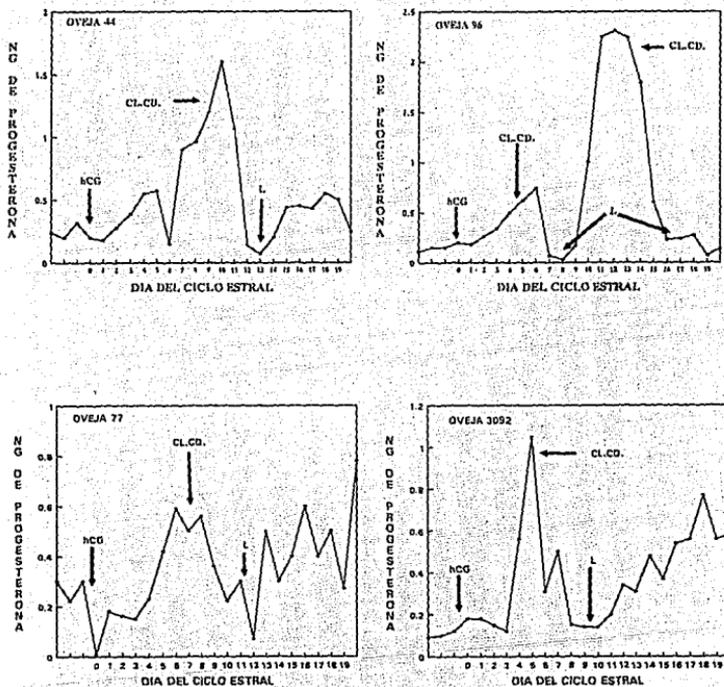


Figura 1. Concentraciones de progesterona plasmática en 4 ovejas que formaron cuerpos lúteos de corta duración después de ser inducidas a ciclar con gonadotropina coriónica humana (hCG) y no ser tratadas con líquido folicular equino. Las flechas indican el momento de la aplicación de hCG, los cuerpos lúteos de corta duración (CL.CD) y el momento en que ocurrió la luteólisis (L).

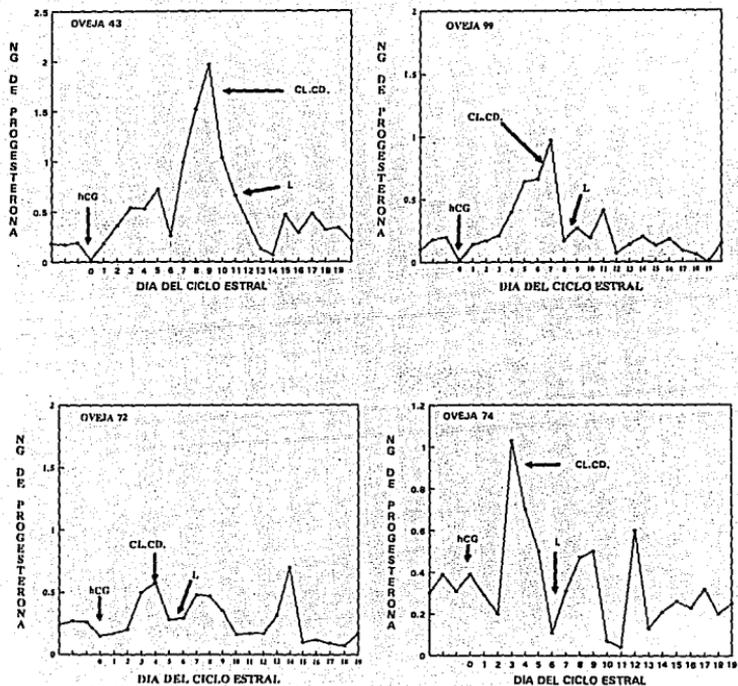


Figura 2. Concentraciones de progesterona plasmática en 4 ovejas que formaron cuerpos lúteos de corta duración, después de ser inducidas a ciclar con gonadotropina coriónica humana (hCG) y no ser tratadas con líquido folicular equino. Las flechas indican el momento de la aplicación de hCG, los cuerpos lúteos de corta duración (CL.CD) y el momento en que ocurrió la luteólisis (L).

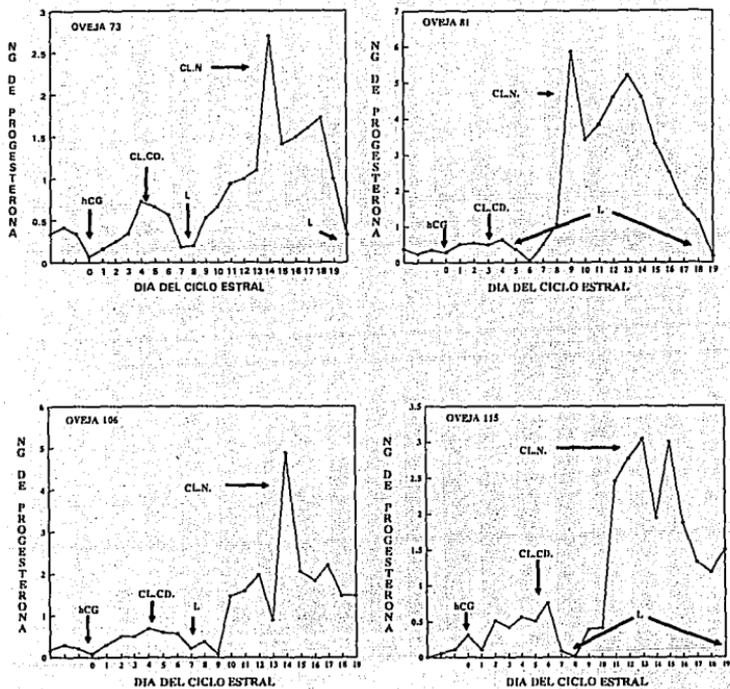


Figura 3. Concentraciones de progesterona plasmática en 4 ovejas que formaron cuerpos lúteos de corta duración, después de ser inducidas a ciclar con gonadotropina coriónica humana (hCG) y no ser tratadas con líquido folicular equino. Las flechas indican el momento de la aplicación de hCG, los cuerpos lúteos de corta duración (CL.CD) y el momento en que ocurrió la luteólisis (L). Además estas ovejas tuvieron la oportunidad de volver a ovular y desarrollaron un cuerpo lúteo de duración normal (CL.N).

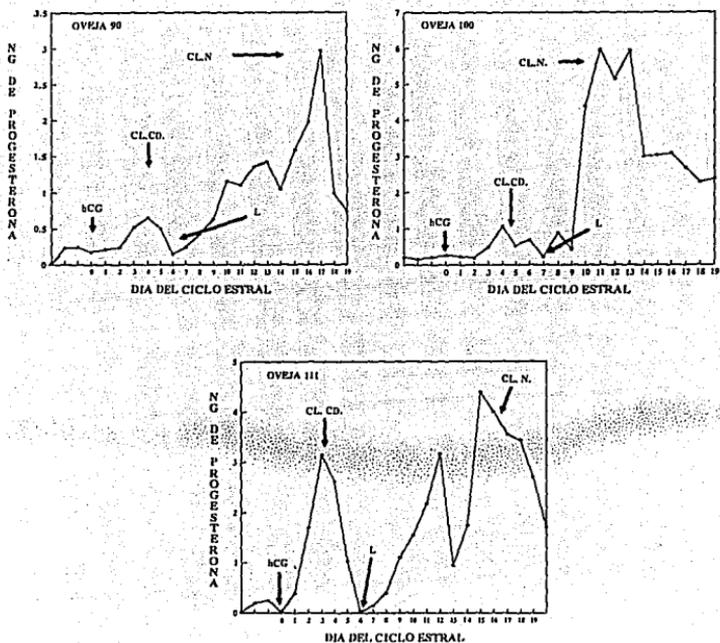


Figura 4. Concentraciones de progesterona plasmática en 3 ovejas que formaron cuerpos lúteos de corta duración, después de ser inducidas a ciclar con gonadotropina coriónica humana (hCG) y no ser tratadas con líquido folicular equino. Las flechas indican el momento de la aplicación de hCG, los cuerpos lúteos de corta duración (CL.CD) y el momento en que ocurrió la luteólisis (L). Además estas ovejas tuvieron la oportunidad de volver a ovular y desarrollaron un cuerpo lúteo de duración normal (CL.N).

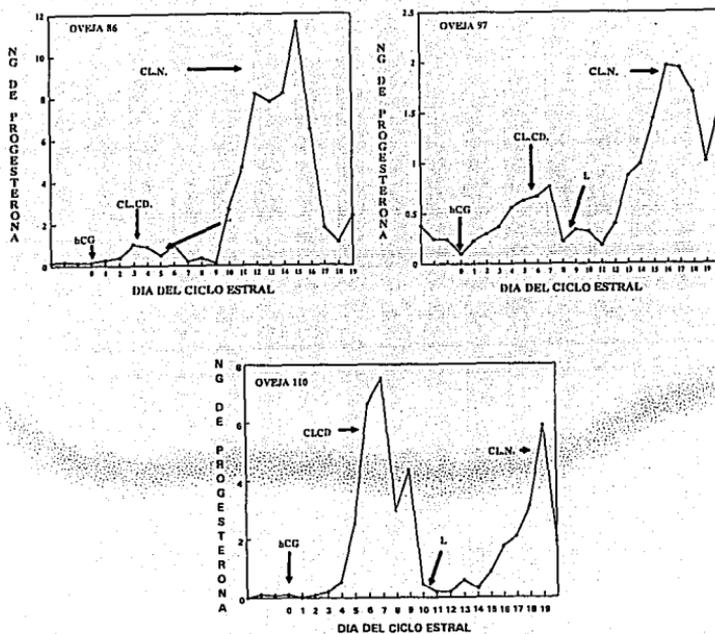


Figura 5. Concentraciones de progesterona plasmática en 3 ovejas que formaron cuerpos lúteos de corta duración, después de ser inducidas a ciclar con gonadotropina coriónica humana (hCG) y no ser tratadas con líquido folicular equino. Las flechas indican el momento de la aplicación de hCG, los cuerpos lúteos de corta duración (CL.CD) y el momento en que ocurrió la luteólisis (L). Además estas ovejas tuvieron la oportunidad de volver a ovular y desarrollaron un cuerpo lúteo de duración normal (CL.N).

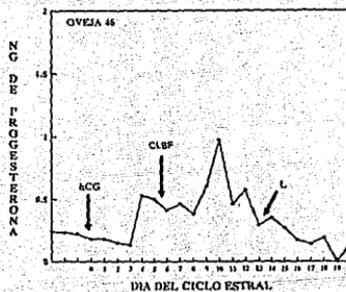
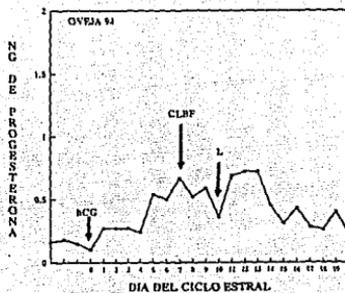


Figura 6. Concentraciones de progesterona plasmática en 2 ovejas que tuvieron función lútea deficiente (CLBF), después de la inducción de la ovulación con gonadotropina coriónica humana (hCG) y no recibir tratamiento con líquido folicular equino.

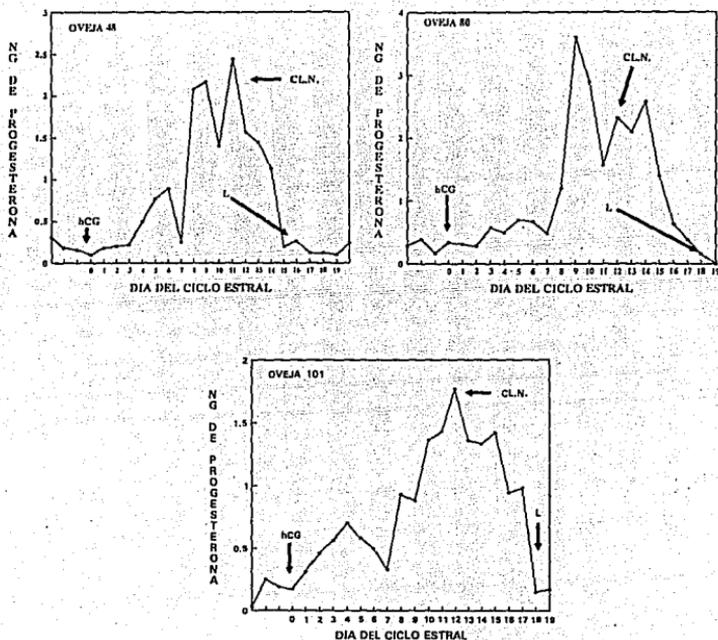


Figura 7. Concentraciones de progesterona plasmática en 3 ovejas no tratadas con líquido folicular equino (LFE), las flechas indican el momento de la aplicación de la Gonadotropina Coriónica humana (hCG), la formación de un cuerpo lúteo de funcionalidad normal (CL.N) y el momento en que ocurrió la luteolisis (L).

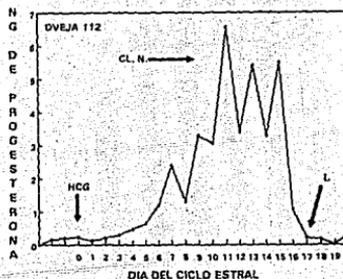
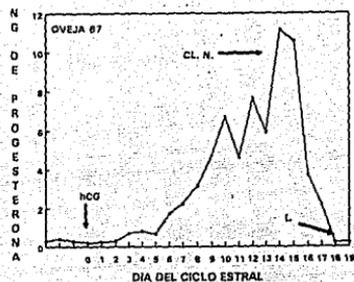


Figura 3. Concentraciones de progesterona plasmática en 2 ovejas no tratadas con líquido folicular equino (LFE), las flechas indican el momento de la aplicación de la Gonadotropina Coriónica humana (hCG), la formación de un cuerpo lúteo de funcionalidad normal (CL.N) y el momento en que ocurrió la luteolisis (L).

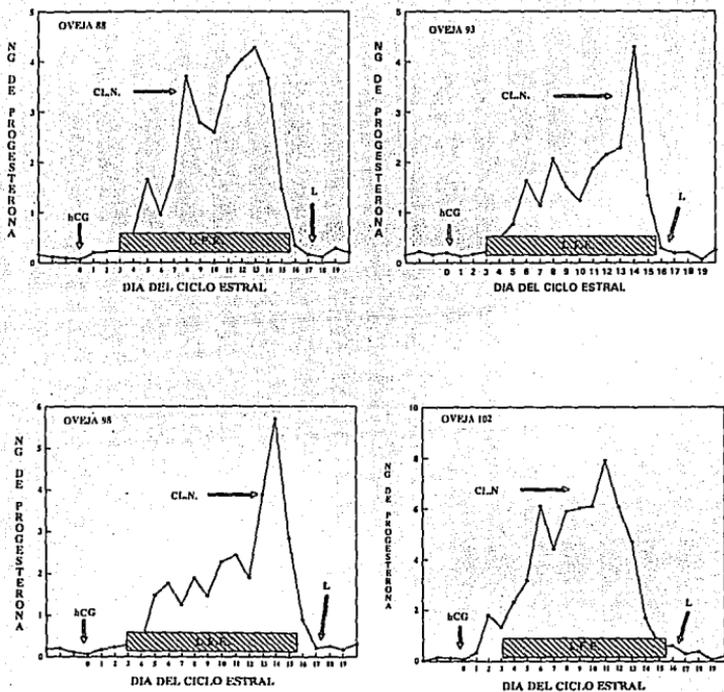


Figura 9. Concentraciones de progesterona plasmática en 4 ovejas tratadas con LFE, las flechas indican la aplicación de la gonadotropina coriónica humana (hCG), la formación de un cuerpo lúteo de funcionalidad normal (CL.N) y el momento de la luteólisis (L), la barra horizontal con las siglas LFE indica el período de administración del líquido folicular equino. Nótese que las concentraciones de progesterona se mantienen por encima de 1ng/ml durante 9 días o más.

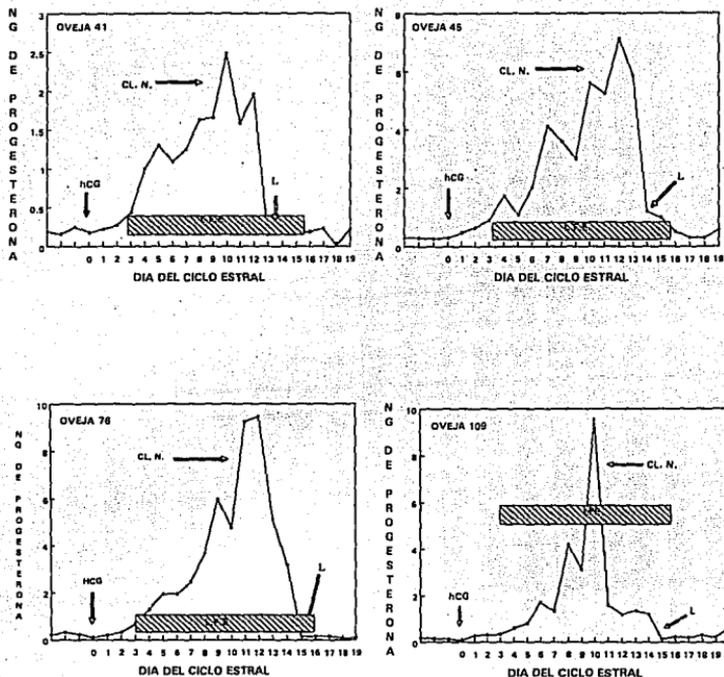


Figura 10. Concentraciones de progesterona plasmática en 4 ovejas tratadas con LFE las flechas indican la aplicación de la gonadotropina coriónica humana (hCG), la formación de un cuerpo lúteo de funcionalidad normal (CL.N) y el momento de la luteólisis (L), la barra horizontal con las siglas LFE indica el período de administración del líquido folicular equino. Nótese que las concentraciones de progesterona se mantienen por encima de 1ng/ml durante 9 días o más.

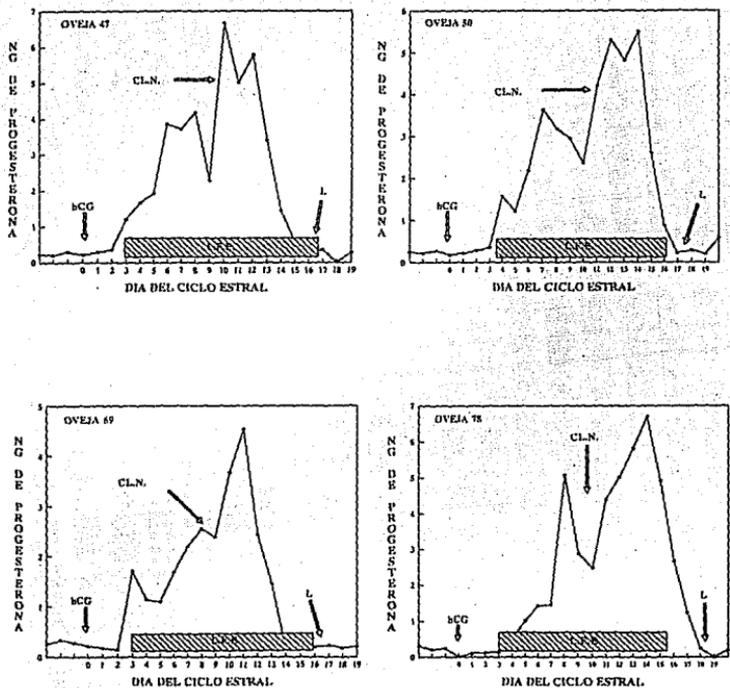


Figura 11. Concentraciones de progesterona plasmática en 4 ovejas tratadas con LFE las flechas indican la aplicación de la gonadotropina coriónica humana (hCG), la formación de un cuerpo lúteo de funcionalidad normal (CL.N) y el momento de la luteólisis (L), la barra horizontal con las siglas LFE indica el período de administración del líquido folicular equino. Nótese que las concentraciones de progesterona se mantienen por encima de 1ng/ml durante 9 días o más.

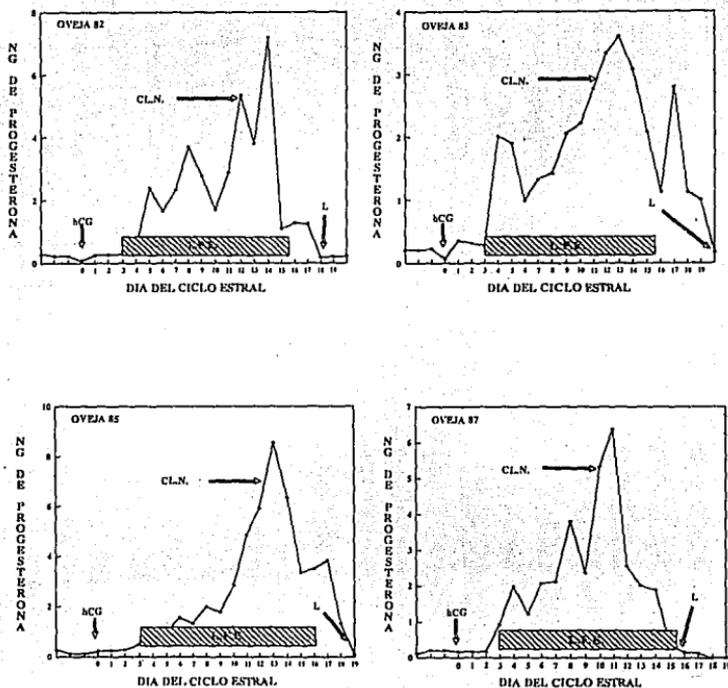


Figura 12. Concentraciones de progesterona plasmática en 4 ovejas tratadas con LFE las flechas indican la aplicación de la gonadotropina coriónica humana (hCG), la formación de un cuerpo lúteo de funcionalidad normal (CL.N) y el momento de la luteólisis (L), la barra horizontal con las siglas LFE indica el período de administración del líquido folicular equino. Nótese que en 3 de las ovejas la duración de la fase lútea es mayor a lo considerado como normal en la oveja.

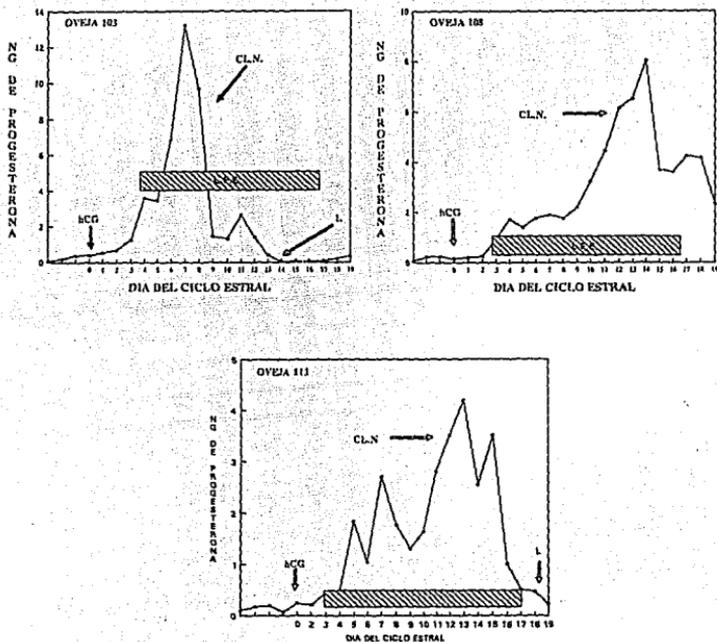


Figura 13. Concentraciones de progesterona plasmática en 3 ovejas tratadas con LFE las flechas indican la aplicación de la gonadotropina coriónica humana (hCG), la formación de un cuerpo lúteo de funcionalidad normal (CL.N) y el momento de la luteólisis (L), la barra horizontal con las siglas LFE indica el período de administración del líquido folicular equino. Nótese que las concentraciones de progesterona se mantienen por encima de 1ng/ml durante 9 días o más.

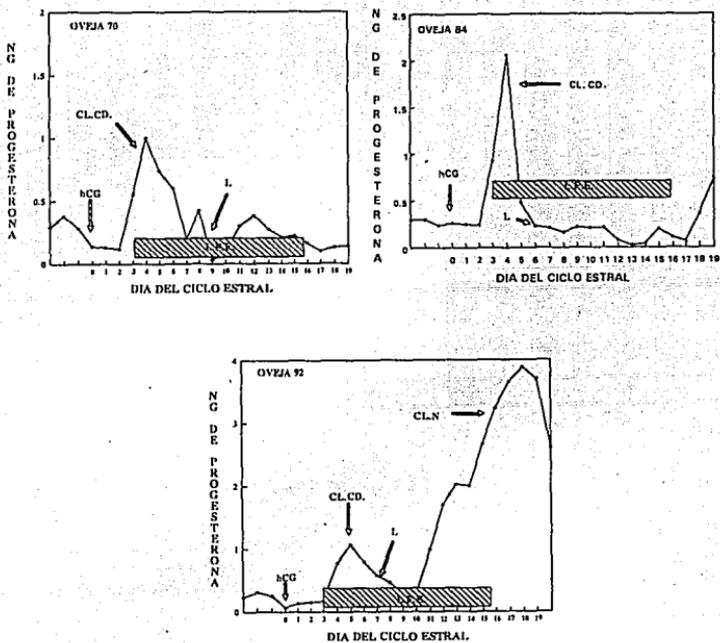


Figura 14 . Concentraciones de progesterona plasmática en 3 ovejas tratadas con líquido folicular equino, las flechas indican el momento de la aplicación de la gonadotropina coriónica humana (hCG), la formación de un cuerpo lúteo de corta duración (CL.CD.) y el momento en que ocurrió la luteólisis (L), la barra horizontal con las siglas LFE indica el período de administración del líquido folicular equino.

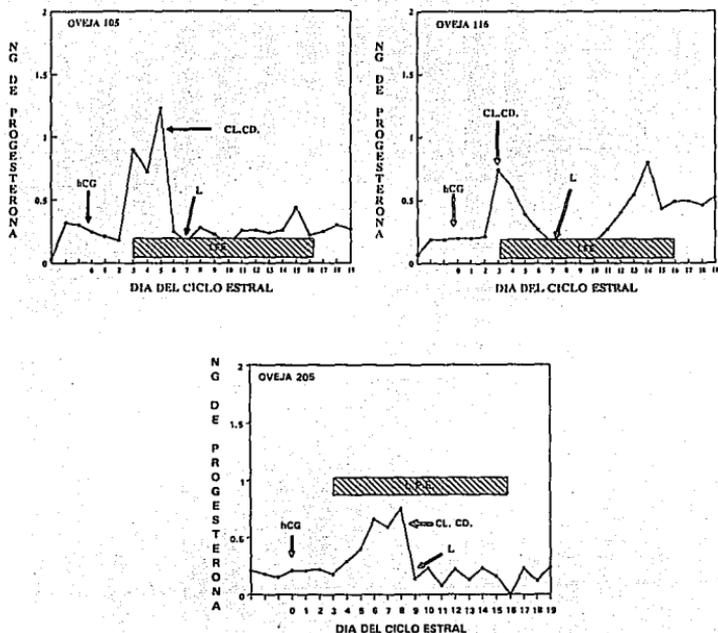


Figura 15 . Concentraciones de progesterona plasmática en 3 ovejas tratadas con líquido folicular equino, las flechas indican el momento de la aplicación de la gonadotropina coriónica humana (hCG), la formación de un cuerpo lúteo de corta duración (CL.CD.) y el momento en que ocurrió la luteólisis (L), la barra horizontal con las siglas LFE indica el período de administración del líquido folicular equino.

#### 4.3 Efecto de la aplicación de líquido folicular equino sobre las concentraciones promedio de progesterona

En el cuadro 1 se muestra que al momento de aplicar la gonadotropina coriónica humana (hCG) (día cero del ciclo estral) no existían diferencias significativas en los niveles de progesterona entre los animales que formaron los grupos tratados y no tratados con líquido folicular equino (LFE). Sin embargo, se observa que a partir del día 5 del ciclo estral inducido las concentraciones de progesterona en las ovejas tratadas con líquido folicular equino fueron significativamente más elevadas que en las ovejas no tratadas ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 1. Concentraciones de progesterona (ng/ml) durante los primeros 7 días del ciclo estral de ovejas tratadas y no tratadas con líquido folicular equino.

| DIA DEL CICLO ESTRAL | NO TRATADAS<br>CON LFE (n=25)<br>MEDIA $\pm$ EEM | TRATADAS<br>CON LFE (n=25)<br>MEDIA $\pm$ EEM |
|----------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 0                    | 0.20 $\pm$ 0.18                                  | 0.21 $\pm$ 0.18                               |
| 2                    | 0.39 $\pm$ 0.18                                  | 0.31 $\pm$ 0.18                               |
| 3                    | 0.88 $\pm$ 0.18                                  | 0.90 $\pm$ 0.18                               |
| 4                    | 0.86 $\pm$ 0.18                                  | 1.41 $\pm$ 0.18                               |
| 5*                   | 0.78 $\pm$ 0.18                                  | 1.54 $\pm$ 0.18                               |
| 6*                   | 0.92 $\pm$ 0.18                                  | 1.79 $\pm$ 0.18                               |
| 7*                   | 0.95 $\pm$ 0.18                                  | 2.71 $\pm$ 0.18                               |

\* En los días indicados con asterisco las concentraciones promedio de progesterona en las ovejas tratadas con LFE son significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) que en las ovejas no tratadas. EEM = error estandar de la media.

En el cuadro 2 se muestran los niveles de progesterona plasmática exclusivamente de ovejas que desarrollaron un cuerpo lúteo de duración normal en los dos grupos experimentales (tratadas y no tratadas con LFE). Se puede observar que al momento de aplicar la hCG (día cero del ciclo estral) no existían diferencias estadísticas. Sin embargo, se observa que desde el momento de la aplicación del LFE en el grupo tratado ( día 3 del ciclo estral) las concentraciones de progesterona en estas ovejas fueron significativamente más elevadas que en las ovejas no tratadas, a pesar de que estas también desarrollaron después de la ovulación un cuerpo lúteo de duración normal ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 2. Niveles de progesterona plasmática (ng/ml) de ovejas tratadas o no con líquido folicular equino, que desarrollaron un cuerpo lúteo de vida funcional normal.

| DIA DEL CICLO<br>ESTRAL | NO TRATADAS CON<br>LFE (n=5) |           | TRATADAS CON<br>LFE (n=19) |           |
|-------------------------|------------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
|                         | Media ± EEM                  | Max - Mix | Media ± EEM                | Max - Mix |
| 0                       | 0.20 ± 0.70                  | 0.34-0.12 | 0.21 ± 0.34                | 0.36-0.10 |
| 2                       | 0.30 ± 0.63                  | 0.46-0.22 | 0.34 ± 0.34                | 1.34-0.14 |
| 3                       | 0.75 ± 0.63                  | 1.37-0.48 | 0.90 ± 0.34                | 2.33-0.26 |
| 4                       | 0.73 ± 0.63                  | 0.80-0.65 | 1.50 ± 0.34                | 3.17-0.49 |
| 5                       | 0.80 ± 0.63                  | 1.20-0.58 | 1.83 ± 0.34                | 6.12-0.96 |
| 6                       | 1.11 ± 0.63                  | 2.38-0.45 | 2.09 ± 0.34                | 4.43-1.04 |
| 7                       | 1.40 ± 0.63                  | 2.23-0.75 | 2.88 ± 0.34                | 5.90-1.34 |
| 8                       | 2.13 ± 0.63                  | 3.29-1.00 | 2.71 ± 0.34                | 6.02-1.46 |
| 9                       | 2.46 ± 0.63                  | 4.17-1.00 | 2.88 ± 0.34                | 6.11-1.23 |
| 10                      | 3.69 ± 0.63                  | 6.56-1.45 | 3.62 ± 0.34                | 7.90-1.64 |
| 11                      | 2.66 ± 0.63                  | 4.90-1.56 | 4.39 ± 0.34                | 7.39-1.79 |
| 12                      | 3.29 ± 0.63                  | 5.56-1.67 | 4.22 ± 0.34                | 7.72-0.99 |
| 13                      | 2.49 ± 0.63                  | 5.28-0.72 | 3.84 ± 0.34                | 7.20-0.16 |
| 14                      | 3.94 ± 0.63                  | 9.94-0.20 | 2.25 ± 0.34                | 6.61-0.19 |
| 15                      | 2.75 ± 0.63                  | 9.06-0.26 | 1.51 ± 0.34                | 6.35-0.17 |
| 16                      | 1.45 ± 0.63                  | 5.23-0.12 | 1.35 ± 0.34                | 6.17-0.16 |
| 17                      | 0.75 ± 0.63                  | 2.14-0.12 | 0.75 ± 0.34                | 4.24-0.12 |
| 18                      | 0.16 ± 0.63                  | 0.30-0.01 | 0.55 ± 0.34                | 4.16-0.01 |
| 19                      | 0.19 ± 0.63                  | 0.31-0.00 | 0.36 ± 0.34                | 2.33-0.02 |
| total                   | 1.64 ± 0.14                  | 3.62-0.59 | 2.01 ± 0.07                | 5.08-0.64 |

Las concentraciones promedio (ng/ml) de progesterona en las ovejas tratadas con LFE son significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) que en las ovejas no tratadas. EEM= error estandar de la media. Min= valores mínimos, Max= valores máximos.

En el cuadro 3 se muestran los niveles de progesterona plasmática (durante los primeros 8 días del ciclo estral) exclusivamente de ovejas que desarrollaron un cuerpo lúteo de corta duración en los dos grupos experimentales (tratadas y no tratadas con LFE); donde se puede observar que desde el momento de aplicar la hCG (día cero del ciclo estral) no existieron diferencias estadísticas entre los dos tratamientos ( $P > 0.05$ ).

Cuadro 3. Niveles de progesterona plasmática (ng/ml) durante los primeros 8 días de ovejas tratadas o no con líquido folicular equino, que desarrollaron un cuerpo lúteo de corta duración.

| DIA DEL CICLO<br>ESTRAL | NO TRATADAS CON<br>LFE (n=20) | TRATADAS CON<br>LFE (n=6) |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------------|
|                         | Media ± EEM                   | Media ± EEM               |
| 0                       | 0.19 ± 0.22                   | 0.19 ± 0.40               |
| 2                       | 0.41 ± 0.22                   | 0.19 ± 0.40               |
| 3                       | 0.87 ± 0.22                   | 0.83 ± 0.40               |
| 4                       | 0.85 ± 0.22                   | 1.02 ± 0.40               |
| 5                       | 0.63 ± 0.22                   | 0.91 ± 0.40               |
| 6                       | 0.91 ± 0.22                   | 0.80 ± 0.40               |
| 7                       | 0.20 ± 0.22                   | 0.31 ± 0.40               |
| 8                       | 0.01 ± 0.22                   | 0.29 ± 0.40               |

EEM=Error estandar de la media.

Al comparar el área bajo la curva de progesterona durante la primera fase lútea de los animales tratados y no tratados con LFE se encontró que fue significativamente mayor ( $P < 0.01$ ) en el grupo tratado con LFE ( $27.8 \pm 3.43 \text{ cm}^2$ ) que en el grupo no tratado ( $8.81 \pm 3.43 \text{ cm}^2$ ) (figura 16).

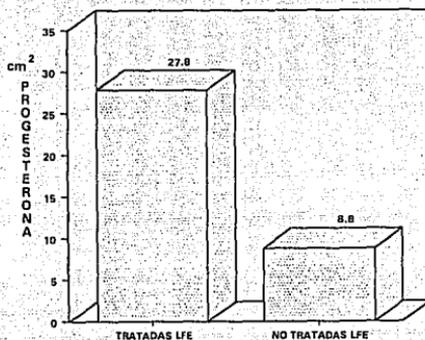


Figura 16 . Concentraciones de progesterona ( $\text{cm}^2$ ) durante la primera fase lútea en animales tratados y no tratados con LFE.

Al analizar en que día después de la aplicación de hCG se elevaron las concentraciones de progesterona hasta  $0.5 \text{ ng/ml}$  en los animales que formaron los grupos tratados y no tratados con LFE ( $3.22 \pm 0.20$  vs  $3.34 \pm 0.29$  respectivamente) no se observaron diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) entre los dos tratamientos. Tampoco se pudo apreciar diferencia estadística ( $p > 0.05$ ) en el día en que las concentraciones de progesterona llegaron a más de  $1 \text{ ng/ml}$  en el grupo de ovejas no tratadas con LFE y en el grupo tratado con LFE ( $3.86 \pm 0.19$  vs  $3.55 \pm 0.31$ ) respectivamente, tomando solo en cuenta aquellas ovejas en que la progesterona se elevó a más de  $1 \text{ ng/ml}$ .

#### 4.4 Efecto de la aplicación de hCG sobre la duración de la primera fase lútea

En el cuadro 4 se muestra el efecto de la aplicación de la gonadotropina coriónica humana (hCG) sobre la duración de la fase lútea en ovejas tratadas y no tratadas con líquido folicular equino (LFE). En el grupo no tratado con LFE, las concentraciones de progesterona se mantienen entre 0.5 y 1.0 ng/ml durante  $2.82 \pm 0.18$  días, para luego elevarse a más de 1 ng/ml durante  $5.0 \pm 0.49$  días.

En las ovejas tratadas con LFE la duración del período en el cual las concentraciones de progesterona fluctúan entre 0.5 y 1.0 ng/ml es significativamente ( $P < 0.01$ ) más corto ( $1.66 \pm 0.21$  días), pero la duración de las concentraciones mayores a 1.0 ng/ml es significativamente ( $P < 0.01$ ), más largo ( $9.95 \pm 0.93$  días). Como resultado, la duración total de la fase lútea (desde que la progesterona supera 0.5 ng/ml hasta que vuelve a bajar a menos de 0.5 ng/ml es significativamente mayor ( $P < 0.01$ ) en ovejas tratadas con LFE ( $10.3 \pm 0.80$  días) que en las no tratadas ( $4.4 \pm 0.80$  días).

Cuadro 4. Efecto de la aplicación de hCG sobre la duración (días) de la primera fase lútea en ovejas tratadas y no tratadas con LFE.

| CONCENTRACIONES<br>DE PROGESTERONA<br>(ng/ml) | DURACION ( DIAS )                      |                                           |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------|
|                                               | TRATADAS<br>CON LFE<br>MEDIA $\pm$ EEM | NO TRATADAS<br>CON LFE<br>MEDIA $\pm$ EEM |
| 0.5 - 1.0                                     | 1.66 $\pm$ 0.21a                       | 2.82 $\pm$ 0.21b                          |
| > 1.0                                         | 9.95 $\pm$ 0.93a                       | 2.00 $\pm$ 0.49b                          |
| duración total<br>de la 1ª fase<br>lútea.     | 10.32 $\pm$ 0.80a                      | 4.4 $\pm$ 0.80b                           |

a, b para una determinada variable (renglón) las literales diferentes indican diferencias estadísticas entre grupos ( $P < 0.01$ ). EEM = error estandar de la media.

#### 4.5 Efecto de la aplicación del líquido folicular equino sobre la luteólisis

La aplicación de LFE prolongó la duración de la fase lútea en las ovejas tratadas con LFE en comparación con las ovejas no tratadas, ya que en el grupo tratado la luteólisis de la primera fase lútea se presentó en promedio en el día  $13.7 \pm 0.82$  en comparación con el grupo no tratado, en el cual la luteólisis ocurrió en promedio en el día  $7.6 \pm 0.82$  observándose una diferencia estadística significativa ( $P < 0.01$ ) entre los dos grupos.

#### 4.6 Efecto de la aplicación del líquido folicular equino sobre las concentraciones de estradiol en folículos

Al analizar las concentraciones de estradiol (día 15 del ciclo estral) en el líquido folicular de ovejas tratadas y no tratadas con el LFE, se pudo apreciar que en el grupo tratado con LFE estas fueron estadísticamente menores ( $P < 0.05$ ) que en el grupo no tratado ( $41.20 \pm 87.04$  vs  $303.87 \pm 93.05$  pg/ml respectivamente).

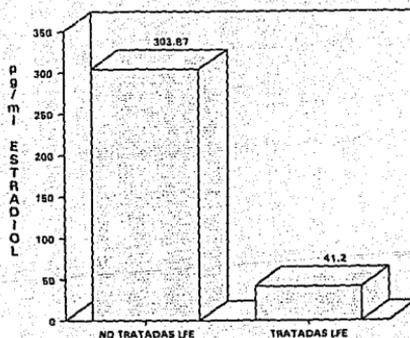


Figura 17. Concentraciones de estradiol (pg/ml) de ovejas tratadas y no tratadas con líquido folicular equino libre de esteroides

## V DISCUSION

### 5.1 Efecto de la aplicación del líquido folicular equino sobre la fertilidad

En el presente trabajo se confirmó lo informado por otros autores que observaron que la aplicación de gonadotropina coriónica humana (hCG), en animales en anestro induce en forma repetible la ovulación y la formación de cuerpos lúteos de corta duración (McNatty *et al*, 1984; McLeod *et al*, 1982a, 1982b; O'Shea *et al*, 1984; Southee *et al*, 1988a, 1988b; Driancourt *et al*, 1990). El hecho de que en la mayoría de las ovejas tratadas con LFE se haya presentado una fase lútea de duración normal y con concentraciones normales de progesterona demuestra que el tratamiento con hCG realmente provoca la ovulación y no una simple luteinización folicular, como podría pensarse a partir de las bajas concentraciones de progesterona y corta duración de dicha elevación en las ovejas que no recibieron LFE.

Cuando se induce a ovular a ovejas que están en anestro estacional o puberal, la ovulación inducida ocurre sin manifestaciones de estro (Burfening *et al*, 1971; Edey *et al*, 1978; Burfening y Berardinelli, 1986), por lo que las ovejas no son receptivas al macho.

Lo cual se confirmó en el presente trabajo ya que el 100% de las ovejas inducidas a ovular la primera ovulación fue silenciosa, coincidiendo con lo informado por otros autores (Burfening *et al*, 1971; Balcázar, 1992).

La razón por la cual esta primera ovulación es silenciosa se debe a que el sistema nervioso debe de estar previamente sensibilizado con progesterona, para que pueda responder a los estrógenos producidos por el folículo (McLeod *et al*, 1982b; McLeod y Haresing, 1984). El pretratamiento con progesterona antes de la aplicación de la hCG ocasiona que se presente estro conductual. Sin embargo, también resulta en la formación de cuerpos lúteos de duración normal, por lo que no sería un tratamiento adecuado para el presente estudio, en el que se pretendía inducir la formación de cuerpos lúteos de corta duración (McLeod *et al*, 1984; Hunter *et al*, 1986).

La fertilidad que se obtuvo en este experimento fue del 0% en los dos grupos (tratado y no tratado con LFE). Probablemente esto se debió a que como ya se mencionó, en las ovejas inducidas a ovular con gonadotropinas sin pretratamiento con progestágenos no hay signos de

estro, lo cual obliga en primer lugar a utilizar inseminación artificial en lugar de monta natural, y en segundo lugar dificulta determinar el momento adecuado para la inseminación de las ovejas. Holst y Moore (1970) mencionan que la detección de calores es un factor determinante para obtener buenos índices de fertilidad al inseminar artificialmente con semen fresco diluido, ya que de esta manera se evita inseminar a las hembras antes o después de lo debido. Además, Schindler y Amir (1973) mencionan también que aparte del tiempo adecuado para inseminar se debe de tomar en cuenta la viabilidad del espermatozoide, ya que esta va disminuyendo a medida que se tarde más en inseminar, independientemente del diluyente en que se encuentre.

Otra posible causa de la infertilidad observada en el presente estudio quizá se deba a lo informado por Jacqueline et al, (1989), quienes estudiaron las causas de infertilidad de ovejas postparto e inducidas a ovular con PMSG sin pretratamiento con progestágenos, mencionando que el cuerpo lúteo de corta duración no es la única causa de problemas en la gestación de estos animales, sino que se presenta mortalidad embrionaria causada por un inapropiado medio ambiente uterino, además de una inhabilidad del embrión para producir sustancias luteotrópicas. Desgraciadamente, estos autores no explican a que se debe este inapropiado medio ambiente uterino. Probablemente el útero debe de estar presensibilizado con progesterona de un ciclo anterior para asegurar una función adecuada y así garantizar la gestación. Sin embargo, Echterkamp y Tunstra (1978), mencionan que las fallas en la gestación si pueden deberse a una mortalidad embrionaria temprana, pero que la mejor explicación de infertilidad en ovejas inducidas a ovular con PMSG en anestro estacional, se debe a problemas en el transporte de espermatozoides, ya que en sus experimentos encontraron insuficientes números de espermatozoides viables en el oviducto siendo incapaces de fertilizar el ovocito.

## 5.2 Efecto de la aplicación del LFE sobre las concentraciones de progesterona

Es conocido que al inducir a ovular a ovejas en anestro estacional con GnRH (McLeod *et al* , 1982a, Hunter *et al* ,1986; Southce *et al* , 1988; Hunter *et al* , 1989; Beard *et al* , 1994), LH o hCG (McNeilly,1980; Driancourt *et al* ,1990) se desarrollan cuerpos lúteos de corta duración, los cuales se caracterizan por producir una elevación transitoria de las concentraciones plasmáticas de progesterona (Beard y Hunter, 1994).

En el presente trabajo, se pudo observar que al momento de la aplicación de hCG no existían diferencias significativas en los niveles de progesterona entre los animales que formaban los grupos experimentales. Sin embargo, a partir del día 5 del ciclo estral las concentraciones de progesterona en las ovejas tratadas con LFE fueron significativamente más elevadas que en las ovejas no tratadas (cuadro 1); lo que se debió a que en estas últimas los cuerpos lúteos regresaron en forma prematura, mientras que en las ovejas tratadas con LFE los cuerpos lúteos continuaron su desarrollo para originar un cuerpo lúteo de duración normal (cuadro 4) . El tratamiento con LFE logró corregir la función lútea en forma similar a lo que ocurre cuando se administra un pretratamiento con progestágenos antes de inducir la ovulación con gonadotropinas en animales en anestro. Así, Southce *et al* , (1988b) observaron en ovejas en anestro inducidas a ovular con GnRH, en el grupo pretratado con progesterona las concentraciones de progesterona comenzaban a elevarse paulatinamente, alcanzando una concentración de 2.0 ng/ml en el día 6 del ciclo , lo cual coincide con los niveles de progesterona en las ovejas del grupo tratado con LFE en el presente estudio, incluso estas concentraciones se mantienen hasta el día 13 para posteriormente disminuir a menos de 0.5ng/ml. Anteriormente, McLeod *et al* . (1984) observaron que si se aplicaba un pretratamiento con progestágenos a ovejas inducidas a ovular con GnRH el cuerpo lúteo se mantenía funcional por 12 días, comenzándose a elevar la progesterona en forma paulatina a partir del día 4 del ciclo estral, lo que es similar a lo observado en el presente trabajo en el grupo tratado con LFE.

Como ya se mencionó, en el grupo no tratado con LFE las concentraciones de progesterona comenzaron a disminuir paulatinamente a partir del día 5 ó 6, coincidiendo con lo

informado en bovinos (Copelin *et al* , 1987). McLeod *et al* , (1982b) también observaron que en ovejas en anestro estacional inducidas a ovular con GnRH las concentraciones de progesterona plasmática alrededor del día 4 del ciclo no eran mayores a 0.8 ng/ml coincidiendo con las concentraciones de progesterona en el día 4 (0.86 ng/ml) en las ovejas no tratadas con LFE en el presente trabajo y con los de las ovejas de Southee *et al* , (1988a y 1988b) en los grupos no pretratados con progestágenos y no hysterectomizados. Recientemente, Beard y Hunter (1994) realizaron un experimento en ovejas en anestro estacional inducidas a ovular con GnRH, y tratadas con líquido folicular bovino, en sus resultados únicamente mencionan que las ovejas no tratadas con líquido folicular bovino presentaban una anormal función lútea y en las ovejas tratadas, el líquido prolongaba la funcionalidad del cuerpo lúteo, pero no mencionan cuanto tiempo duró esa función lútea normal y anormal, ni qué valores de progesterona presentaban .

Otro efecto interesante que se presentó en el presente trabajo, fue que cuando se analizó por separado las concentraciones de progesterona en las ovejas de los dos grupos experimentales (tratado y no tratado con LFE) que desarrollaron un cuerpo lúteo de duración normal, fue que en las ovejas tratadas con LFE las concentraciones de progesterona comenzaron a elevarse a niveles de casi 1 ng/ml (0.90ng/ml) desde que se comenzó a aplicar el LFE (día 3 del ciclo estral) y siempre presentaron niveles más elevados de progesterona que las ovejas no tratadas con LFE que también presentaron un cuerpo lúteo de duración normal. Este efecto se debe en parte a la supresión de la luteólisis prematura, que se presenta en animales inducidos a ovular sin pretratamiento con progestágenos. Adicionalmente, es posible que el LFE en las ovejas tratadas, de alguna manera corrigió la función y duración de la fase lútea, de tal forma que los perfiles de progesterona fueron similares o incluso mayores a los que se obtienen cuando se usa un pretratamiento con progestágenos antes de la inducción de la ovulación con GnRH (MacLeod *et al* , 1988b ; Hunter *et al* ,1989; Hunter, 1991) o a los observados durante un ciclo estral normal en época reproductiva ( Romero *et al* , 1989). Tal vez el LFE haya estimulando a las células lúteas para que produzcan más progesterona a

traves de un efecto sobre la secreción de LH , ya que anteriormente, Hunter *et al* , (1988) ; McLeod y McNeilly, (1991) mencionaron que el líquido folicular bovino en ovejas en anestro inducidas a ovular incrementaba las concentraciones y la frecuencia de secreción de LH. El efecto de elevación en las concentraciones de progesterona observado en las ovejas tratadas con LFE en el presente trabajo, coincide con lo informado por Mejía (1995), quien observó que en ovejas a las que se les transfirieron embriones en forma asincrónica y fueron tratadas con LFE los niveles de progesterona fueron superiores a las ovejas que recibieron embriones en forma sincrónica y que no fueron tratadas con LFE. Sin embargo, Wallace y McNeilly, (1986) , Larson *et al* , (1991) y Beard y Hunter, (1994) mencionan, que el líquido folicular bovino no tiene ningún efecto sobre la fase lútea ni sobre las concentraciones de progesterona en ovejas.

La similitud entre los perfiles de progesterona de las ovejas tratadas con hCG y LFE y aquellas ciclando normalmente o pretratadas con progestágenos antes del tratamiento con GnRH indica que el cuerpo lúteo que se forma a partir de la inducción de la ovulación con hCG es intrínsecamente normal, y que sólo se requiere evitar la luteólisis prematura para que complete su período de funcionalidad.

Los perfiles de progesterona observados en este trabajo en aquellas ovejas que desarrollaron un cuerpo lúteo de duración normal, a pesar de no haber sido tratadas con LFE son similares a los que se encuentran durante el ciclo estral normal durante la época reproductiva, en las cuales las concentraciones de progesterona comienzan a elevarse paulatinamente durante los primeros 3 días, llegando a valores de entre 0.5 y 1 ng/ml en el día 4 para que entre el día 5 al 8 alcancen su máxima concentración (1.5 a 3 ng/ml) ( Bindon *et al* , 1979; Quirke *et al* , 1979; Romero *et al* , 1984 ). Posteriormente estas concentraciones se mantienen relativamente constantes hasta el día 14, para posteriormente alcanzar niveles basales por efecto de la luteólisis (Zarco *et al* , 1988a). Estos perfiles también son similares a los de ovejas en anestro inducidas a ovular con GnRH después de ser pretatadas con progestágenos ( Baird *et al* , 1976; McLeod *et al* , 1982; McLeod y Haresing, 1984; Zhang *et al* , 1991 ).

Al analizar por separado las concentraciones de progesterona en las ovejas que desarrollaron un cuerpo lúteo de corta duración en los dos grupos experimentales (tratadas y no tratadas con LFE) no se observaron diferencias estadísticas entre estos grupos. Esto permite afirmar que el LFE utilizado estaba libre de progesterona, lo cual pudiera haber sido la causa de que al comparar solamente animales con cuerpo lúteo de duración normal, las concentraciones de progesterona fueran superiores en los animales del grupo tratado con LFE que en las del grupo no tratado. Al analizar en conjunto estos resultados (los dos grupos experimentales) coinciden con los datos informados por otros autores, que han observado cuerpos lúteos de corta duración (Berardinelli *et al* , 1980 ; McLeod *et al* , 1982b ; McLeod y Haresing, 1984; Quirke *et al* , 1985; Hunter, 1991; Beard y Hunter, 1994). Sin embargo, ninguno de estos autores mencionan con exactitud qué niveles alcanzan y por cuánto tiempo, sólo mencionan que estas concentraciones fluctúan entre 0.5 ng/ml hasta 1 ng/ml, y tampoco dan una explicación de que está ocurriendo.

### 5.3 Efecto de la aplicación del LFE sobre la duración de la primera fase lútea y el momento de la luteólisis

En el grupo no tratado con LFE se encontró que un 80% de los animales (n=20) formaron un cuerpo lúteo de corta duración (CLCD) después de la inducción de la ovulación, lo cual coincide con lo informado por Benoit, (1991) citado por Dailey *et al* , (1992) quien indujo a ovular también a ovejas en anestro estacional utilizando hCG y obtuvo un 72% de CLCD. El porcentaje de CLCD que se produce con hCG parece ser ligeramente superior al que se produce cuando se induce a ovejas en anestro con GnRH sin un pretratamiento con progestágenos, en cuyo caso los CLCD se presentan entre un 50 % y un 60% de los casos ( Hunter *et al* , 1986; Beard y Hunter, 1994).

Probablemente el porcentaje ligeramente menor de CLCD que se obtiene al inducir a ovular con GnRH, se deba a que esta hormona está estimulando la producción de gonadotropinas desde hipófisis, lo que podría ser más natural al efecto directo sobre el ovario que ocurre con la hCG. Incluso se ha observado que las ovulaciones inducidas con GnRH son

precedidas por un pico de LH que es similar en magnitud y duración a los que ocurren en ovejas adultas próximas a ovular ( Chu *et al* , 1979; McLeod *et al* , 1982a ;McLeod y Haresing, 1984). Por esta razón, la inducción de la ovulación con GnRH puede ser más "natural" que la inducción con hCG.

Algunos autores han sugerido que cuando se induce a ovular a ovejas en anestro con LH o hCG se está estimulando directamente a un folículo "inmaduro" para que este ovule, ocasionando que en las células de la teca la hCG ocupe los receptores para LH y en las células de la granulosa se sinteticen receptores también para LH y comiencen a luteinizarse. En este momento los receptores para LH disminuyen en número ( efecto conocido en ingles como "down-regulation"), además esta estimulación sería acompañada por una baja en la actividad de la adenil ciclasa , la cual esta relacionada directamente con la baja de receptores, además de ocasionar un daño en estas células lúteas ( Scaramizzi *et al* , 1971; Radford *et al*, 1984; O 'Shea *et al* , 1986; Webb *et al* , 1981 y 1982). Sin embargo, los resultados del presente trabajo demuestran que no existe un daño lúteo, ya que si se le da la oportunidad de funcionar al evitar la luteólisis prematura, el cuerpo lúteo funcionará normalmente, tanto en su capacidad de producir progesterona como en su duración.

Como ya se mencionó, en el presente trabajo el 88% de las ovejas inducidas a ovular formaron un CLCD, el cual tuvo una duración promedio de  $4.4 \pm 0.23$  días ocurriendo la luteólisis en promedio el día 7.6, lo cual coincide con lo informado por otros autores ( McLeod *et al*, 1982; Southee *et al* , 1988; Hunter *et al* , 1989; Keisler y Keisler, 1989; Hunter, 1991; Beard *et al* , 1994).

Recientes investigaciones han informado que el cuerpo lúteo de corta duración es intrínsecamente normal (Hunter *et al*, 1988; Garverick *et al*, 1992a ), y que su corta vida se debe en realidad a una programación inadecuada de la secreción de prostaglandinas uterinas ( Southee *et al*, 1988b; Copelin *et al*, 1989; Hunter *et al*, 1989; Peter *et al*, 1989; Cooper *et al*, 1991). De ésta manera, la falta de exposición uterina a la progesterona durante el ciclo estral previo, resulta en la aparición prematura de receptores para estrógenos y oxitocina (Zollers *et al*, 1989; Hunter, 1991; Vallet *et al*, 1991; Lau *et al*, 1992; Zollers *et al*, 1992), lo que

conduce al establecimiento prematuro de un patrón de secreción luteolítico de  $\text{PGF2}\alpha$  (Hunter *et al.*, 1989; Cooper *et al.*, 1991, Zollers *et al.*, 1991). Los resultados del presente experimento apoyan esta hipótesis, ya que al suprimir el desarrollo folicular probablemente se interfirió en los mecanismos normales del establecimiento del patrón luteolítico de secreción de ( $\text{PGF2}\alpha$ ) (Beard y Hunter, 1994), lo que resultó en una fase lútea normal.

Otra evidencia que hace suponer que la corta vida funcional del cuerpo lúteo es debida a una liberación anticipada de  $\text{PGF2}\alpha$  es el hecho que en ovejas en anestro estacional inducidas a ovular con GnRH, gonadotropina coriónica equina (eCG) ó gonadotropina coriónica humana (hCG) pretratadas o no con progestágenos sintéticos e histerectomizadas o no, se observó que las ovejas histerectomizadas desarrollaban un cuerpo lúteo de vida funcional normal aún cuando no fueran tratadas con progestágenos. En cambio las ovejas no pretratadas ni histerectomizadas desarrollaban un cuerpo lúteo de corta duración (CLCD) lo mismo se observó en ovejas prepúberes no histerectomizadas ( Keisler *et al.* , 1983; Southee *et al.* , 1988b; Hu *et al.* , 1991; Hunter, 1991 ).

Hunter *et al.* , (1988) mencionan que las bajas producciones de progesterona plasmática que se observan en los últimos días en los CLCD se deben a que este sufre prematuramente una lisis de manera similar a la que ocurre en un CL de funcionalidad normal.

Braden *et al.* , (1989a) mencionan que probablemente el CLCD es más sensible a la acción de la  $\text{PGF2}\alpha$ , lo cual probablemente sea la razón de que en las ovejas inducidas a ovular con GnRH que desarrollaron un CLCD y un CLN por efecto de la administración de líquido folicular bovino tengan los mismos niveles en el metabolito de la prostaglandina  $\text{F2}\alpha$  (PGFM) (Beard y Hunter, 1994).

Incluso en trabajos anteriores, donde se evaluó el efecto luteolítico de la  $\text{PGF2}\alpha$  en diferentes días del ciclo estral en la oveja se pudo comprobar que justamente entre los días 4 y 5 del ciclo estral el cuerpo lúteo de las ovejas es sensible a la acción luteolítica de la  $\text{PGF2}\alpha$  ( Hearnshaw *et al.* , 1973; Hackett y Robertson , 1980; Herrera *et al.* , 1990 ) lo cual coincide con los días en que regresa el CLCD en ovejas inducidas a ovular con gonadotropinas sin un

pretratamiento con progestágenos o con un pretratamiento con líquido folicular libre de esteroides (Beard y Hunter, 1994).

Es conocido que tanto las células chicas como las grandes que componen el CL tienen diferentes sitios de unión para las PGF2 $\alpha$  y la afinidad de estos sitios varía según la etapa del ciclo estral, de ahí la diferente sensibilidad a la PGF2 $\alpha$  (Bartol *et al.*, 1981; Wakeling y Green, 1981). Por ejemplo se sabe que al inducir la ovulación con LH o hCG se incrementa el número de células grandes y disminuye el número de células chicas lo cual apoya la teoría de Donalson y Hansel 1965, de que la LH juega un papel importante en la diferenciación celular.

Probablemente este posible desbalance en el número de células lúteas puede ser el causante de la prematura lisis lútea, ya que las células grandes son las que poseen receptores para PGF2 $\alpha$  y este proceso puede ser mediado por estas células grandes (Manns *et al.*, 1983) o por una incrementada afinidad en los receptores (Rao *et al.*, 1979 citado por Southee *et al.*, 1988b).

El mecanismo por el cual se libera la PGF2 $\alpha$  en el útero, en las ovejas con CLCD es similar al que ocurre en un ciclo estral normal, ya que al momento en que ocurre la luteólisis se ha observado un aumento en el número de receptores a oxitocina los cuales comienzan a aparecer en el día 3 y alcanzan un número mayor en el día 5 (Hunter, 1991; Beard y Hunter, 1994) en ese momento también se ha observado un aumento en los niveles de esta hormona en la circulación, además que estos picos coinciden con aumentos del metabolito de la PGF2 $\alpha$  (PGFM) en el plasma (Hunter *et al.*, 1989; Braden *et al.*, 1989; Hunter, 1991; Beard *et al.*, 1994).

El estradiol producido principalmente por grandes folículos estrogénicos, es el causante de la formación de receptores para oxitocina en el útero, (Baird *et al.*, 1976; McCracken *et al.*, 1984). Canson *et al.*, (1984) plantea la hipótesis de que los folículos pequeños considerados como "no estrogénicos" (menores a 2mm de diámetro) que se desarrollan después de la ovulación producen pequeñas cantidades de estradiol, las cuales en conjunto son las necesarias para desencadenar la síntesis de receptores para oxitocina en útero y de esta manera desencadenar el proceso de luteólisis. Esto ya había sido sugerido por Armstrong *et al.*,

(1980), quienes observaron que folículos con un diámetro de 1 a 3mm presentan receptores para FSH en las células de la granulosa las cuales contribuyen en la producción de estradiol en forma importante.

En el 76 % de las ovejas del grupo tratado con LFE , la primera fase lútea se alargó por más de 13 días, ocurriendo la luteólisis en el día 13.7 en promedio, lo cual coincide con lo informado con Larson *et al.* (1987) (citado por Dailey *et al.*, 1992) quienes en ovejas ciclando y tratadas con líquido folicular bovino libre de hormonas esteroides (LFB) aplicado en los días 11 ó 15 lograron retrasar la luteólisis 3 días, resultados similares logró obtener Miquelajauregui, (1992) en ovejas tratadas con LFB libre de hormonas esteroides. También Beard y Hunter, (1994) en ovejas en anestro estacional inducidas a ovular con GnRH y tratadas con LFB libre de hormonas esteroides, lograron impedir la lisis del cuerpo lúteo que estaba destinado a tener una vida funcional corta.

La manera en que el líquido folicular libre de esteroides, ya sea de origen bovino o equino, impide la luteólisis probablemente sea de una manera indirecta. Se ha observado que 24 horas después del pico preovulatorio de LH hay una segunda elevación de FSH, que coincide con una disminución en los niveles de estradiol y de androstenediona (Baird *et al.* , 1981; Webb y England citados por Baird *et al.* , 1991). esta elevación en las concentraciones de FSH ocasiona que se desarrollen pequeños folículos que producen pequeñas cantidades de estradiol (Baird *et al.*, 1991). Probablemente el líquido folicular equino suprime este segundo pico de FSH y de esta manera inhiba el crecimiento folicular. Así, estos folículos sufren un proceso de atresia, perdiendo la capacidad de aromatizar y producir estradiol. Al reducirse las concentraciones de estradiol no se ocasionará la síntesis de receptores para oxitocina en útero, impidiendo de esta manera indirecta que se desarrolle el proceso de luteólisis, rescatando el cuerpo lúteo que estaba destinado a tener poca vida funcional.

Cabe hacer mención que un 12% de las ovejas no tratadas con LFE presentaron en la ovulación inducida con hCG la formación de un CL normal. Hunter, (1991) menciona que probablemente las elevaciones transitorias de progesterona que se observan después de la

ovulación son de una magnitud y tiempo suficiente para inhibir de manera adecuada la aparición de receptores para oxitocina en útero e inhibir el crecimiento de folículos en desarrollo y de esta manera inhibir la síntesis de estradiol durante el inicio de la fase lútea y evitar de esta manera la luteólisis, lo cual abre una posibilidad de seleccionar genéticamente a estas ovejas que tienen la habilidad de mantener el CL en la primera ovulación.

#### 5.4 Efecto de la aplicación del LFE sobre las concentraciones de estradiol.

En el presente trabajo se pudo observar que las concentraciones de estradiol variaron estadísticamente ( $P < 0.05$ ), entre las ovejas tratadas o no con LFE. Así en el grupo no tratado con LFE las concentraciones de estradiol fueron de 303.87 pg/ml en promedio, lo cual no concide con lo informado en otros trabajos en donde al estudiar los niveles de estradiol durante el ciclo estral en la oveja han observado, que su producción depende del tamaño del folículo, del aporte de gonadotropinas (FSH y LH), ya que estas hormonas son las responsables de su funcionalidad y de la producción de hormonas esteroides y del momento del ciclo estral en que se tomó la muestra. Así Hunter *et al* , (1986) mencionan que los folículos preovulatorios presentan una concentración de estradiol en el líquido mayor a 100 ng/ml, McNatty *et al* , (1981) mencionan, que las concentraciones de estradiol en el líquido de un folículo ovulatorio pueden alcanzar 1000 ng/ml. Lo cual demuestra que la producción de estradiol es un elemento indicativo del buen desarrollo y funcionalidad de un folículo , ya que McNatty *et al* , (1981a) mencionan que las concentraciones de estradiol están asociadas con altas concentraciones de FSH y LH y que una baja en el aporte de estas hormonas trae como consecuencia una disminución en las concentraciones de estradiol.

Con respecto al grupo tratado con LFE se pudo apreciar que las concentraciones de estradiol en líquido folicular fueron más bajas que las observadas en las ovejas no tratadas 41 pg/ml, lo cual coincide con Beard y Hunter (1994), quienes al inducir a ovular a ovejas en anestro con GnRH y tratadas con líquido folicular bovino, mencionan que las concentraciones de estradiol en el grupo tratado disminuyen significativamente ( $P < 0.001$ ) en comparación con las ovejas del grupo control. Sin embargo, no mencionan a qué niveles descienden estas

concentraciones de estradiol.

En diversos trabajos donde se utilizó líquido folicular libre de esteroides, ya sea de ovino o bovino se menciona que este tratamiento reduce las concentraciones de estradiol circulante a razón de 1 ng/ml y hay un ligero aumento en las concentraciones de hormonas como la testosterona o la androstenediona, aunado con una marcada disminución de los folículos menores a 2 mm de diámetro (Campbell *et al* , 1991; Beard y Hunter, 1994 ).

La manera en que esta actuando el líquido folicular ovino o bovino es inhibiendo las concentraciones de la hormona FSH ya que este líquido es rico en inhibina, la cual actúa selectivamente inhibiendo la secreción de FSH, de esta manera los folículos mayores o iguales a 2mm de diámetro al no recibir un aporte de FSH no inician su desarrollo si no que al contrario sufren un proceso de atresia y una baja en su número ( McNatty *et al* , 1985; McLeod y McNeilly, 1987; Hunter *et al* , 1988; Baird *et al* , 1990; Larson *et al* , 1991; Campbell *et al* , 1991 ).

Campbell *et al* . (1991) menciona que el tratamiento con líquido folicular ovino a ovejas inhibe el crecimiento de folículos mayores o iguales a 2mm de diámetro mediante una supresión de índice mitótico de las células de la granulosa, reduce la secreción de FSH retrasando el desarrollo aun más de estos folículos, alterando de manera drástica la foliologénesis. Incluso, si se analiza las concentraciones de estradiol de ovejas inducidas a ovular pretratadas con progesterona se observa que los folículos de estas ovejas son menores a 2mm y las concentraciones en líquido folicular son de 16.1 ng /ml (Hunter *et al* , 1987).

Si se analizan las concentraciones de estradiol en folículos atrésicos en ovejas ciclando normalmente, se observa que son similares o incluso menores a las obtenidas en este trabajo 47 nM (Carson *et al* , 1981), 69 pg/ml (Tsonis *et al* , 1984).

White *et al* , (1987), encontró que las concentraciones de estradiol de folículos ovinos destinados a tener una función lútea subnormal son generalmente bajas y variables ( 4 a 10 ng /ml ), en el presente trabajo incluso en las ovejas no tratadas las concentraciones de estradiol son mucho menores.

Lo único que coincide en estos trabajos es que un folículo destinado a tener atresia tiene una marcada disminución en su actividad estrogénica (baja en los niveles de estradiol y una elevada concentración en los niveles de andrógenos), además de un bajo aporte en hormonas gonadotrópicas (FSH y LH) en el plasma lo cual trae como consecuencia una marcada disminución en el número de folículos en el ovario y algo que es importante es que estos folículos presentan un disminuido índice mitótico en las células que componen este folículo.

### CONCLUSIONES

El líquido folicular equino libre de esteroides, al igual que otros líquidos foliculares es capaz de inhibir el desarrollo folicular, lo cual posiblemente es logrado mediante la inhibición de la secreción de FSH.

La inhibición del desarrollo folicular resulta en una menor producción de estrógenos, lo que evita el establecimiento prematuro del proceso luteal en ovejas en anestro inducidas a ovular con HCG. Esto permite que el cuerpo lúteo formado como resultado del tratamiento con hCG tenga una duración normal.

## LITERATURA CITADA

- Aiumlamai, A., Odensvik, K., Stabenfeldt, G. and Kindahl, H.: Regulation of prostaglandin biosynthesis with flunixin meglumine in the bovine species. J. Vet. Med. **37**: 16-22 (1990).
- Armstrong, D.T., Weiss, T.J., Selstam, G. and Seamark, R.F.: Hormonal and cellular interactions in follicular steroid biosynthesis by the sheep ovary. J. Reprod. Fert. Suppl **30**: 143-154 (1980).
- Ashworth, C. J.: Synchrony embryo-uterus. Anim. Reprod. Sci. **28**: 259-267 (1992).
- Austin, C.R. and Short, R.V.: Hormonas en la reproducción. Prensa Medica Mexicana. México, D.F., (1982).
- Baird, D. T., Land, R. B., Scaramuzzi, R. J. and Wheeler, A. G.: Endocrine changes associated with luteal regression in the ewe; the secretion of ovarian oestradiol, progesterone and androstenedione and uterine prostaglandin F2 $\alpha$  throughout the oestrus cycle. J. Endocr. **69**: 275-286 (1976).
- Baird, D.T. and Mc Neilly, A. S. : Gonadotrophin control of follicular development and function during the oestrous cycle of the ewe J. Reprod. Fert. (Suppl.) **30**: 119- 133 (1981).
- Baird, D.T., Campbell, B.K. and McNeilly, A.S.: Ovine follicular fluid suppresses the ovarian secretion of androgens, oestradiol and inhibin. J. Endocr. **127**: 23-32. (1990).
- Baird, D. T., Campbell, B. K., Mann, G. E. and McNeilly, A. S.: Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. J. Reprod. Fert. Suppl. **43**: 125-138 (1991).
- Baird, D.T.: Luteotropic control of the corpus luteum. Anim. Reprod. Sci. **28**: 95-102 (1992).
- Balcázar, S. J. Efecto de la suplementación alimenticia sobre la eficiencia reproductiva de corderas pelibuey inducidas a la pubertad con acetato de melengestrol. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., (1992).
- Bartol, F.F., Thatcher, W.W., Bazer, F.W., Kimball, F.A., Chenault, J.R., Wilcox, C.J. and Roberts, R.M.: Effects of oestrous cycle and early pregnancy on bovine uterine, luteal and follicular responses. Biol. Reprod. **24**: 759-776 (1981).
- Bazer, F. W., Thatcher, W. W., Hansen, P. J., Mirando, M. A., Ott, T. L. and Plante, C. : Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants- J. Reprod. Fert. **43 (suppl)**: 39-47 (1991).
- Beard, A. J., Castillo, R. J., McLeod, B. J., Glencross, R. G. and Knight, P. G.: Comparison of the effects of crude and highly-purified bovine inhibin (M, 32,000) on plasma concentrations of FSH and LH in chronically ovariectomized prepubertal heifers. J. Endocr. **125**: 21-30 (1990).
- Beard, A.P. and Hunter, M.G. : Effects of follicular fluid and exogenous oestradiol on the GnRH-induced short phase in anoestrous ewes. J. Reprod. and Fert. **100** : 211- 217 (1994).
- Beard, A.P. and Lamming, G.E.: Oestradiol concentration and the development of the uterine oxytocin receptor and oxytocin-induced PGF2 $\alpha$  release in ewes. J. Reprod. Fert. **100**: 469-475 (1994).

Berardinelli, J.G., Dailey, R.A., Butcher, R.L. and Inskoop, E.K.: Source of circulating progesterone in prepuberal ewes. Biol. Reprod. **22**: 233-236 (1980).

Bergfelt, D.R. and Ginther, O.J.: Delayed follicular development and ovulation following inhibition of FSH with equine follicular fluid in the mare. Theriogenology, **24**: 99-108. (1985).

Bicsak, T.A., Tucker, E.M., Cappel, S., Vaughan, J., Rivier, J., Vale, W. and Hsueh, A.J.W.: Hormonal regulation of granulosa cell inhibin biosynthesis. Endocrinology **119**: 2711-2719 (1986).

Bindon, B.M., Blanc, M.R., Pelletier, J., Terqui, M. and Thimonier, J.: Perioviatory gonadotrophin and ovarian steroid patterns in sheep of breeds with differing fecundity. J. Reprod. Fert. **55**: 15-25 (1979).

Braden, T.D., Gambon, T. and Niswender, G.D.: Effects of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ -induced luteolysis on the populations of cells in the ovine corpus luteum. Biol. Reprod. **39**: 245-253 (1988).

Braden, T.D., King, M.F., Odde, K.G. and Niswender, G.D.: Development of preovulatory follicles expected to form short-lived corpora lutea in beef cows. J. Reprod. Fert. **85**: 97-104 (1989).

Braden, T. D., King, M. F., Odde, K. G. and Niswender, G. D.: Functional and morphologic characteristics of the first corpus luteum formed after parturition in ewes. J. Reprod. Fert. **86**: 525-533 (1989).

Burfening, P.J., Hoversland, A.S., Drummond, J. and Van Horn, J.L.: Supplementation for wintering range ewe lambs: Effect on growth and estrus on ewe lambs. J. Anim. Sci. **33**: 711 (1971).

Burfening, P.J. and Berardinelli, J.G.: Effect of fed treatment and exogenous estrogen and progesterone on puberty and growth rates in ewe lambs. J. Anim. Sci. **63**: 1717-1721 (1986).

Burcher, R.L., Collins, W.E. and Fugo, W.: Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and oestradiol-17 $\beta$  throughout the 4-day oestrous cycle of the rat. Endocrinology **94**: 1704 (1974).

Campbell, B.K., Mann, G.E., McNeilly, A.S. and Baird, D.T. Pulsatile secretion of inhibin, oestradiol and androstenedione by the ovary of the sheep during the oestrous cycle. J. Endocr. **126**: 385-393. (1990).

Campbell, B.K., Pieton, H.M. Mann, G.E., McNeilly, A.S. and Baird, D.T.: Effect of steroid and inhibin-free ovine follicular fluid on ovarian follicles and ovarian hormone secretion. J. Reprod. Fert. **93**: 81-96 (1991).

Carson, R.S., Findlay, J.K., Burger, H.G. and Trounson, A.O.: Estradiol, testosterone and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. Biol. Reprod. **24**: 105-113 (1981).

Chu, T.T., Edey, T.N. and Findlay, J.K.: Pituitary response of prepuberal lambs to oestradiol-17 $\beta$ . Aust. J. Biol. Sci. **32**: 463-467 (1979).

Cooper, D. A., Carver, D. A., Villeneuve, P., Silvia, W. J., and Inskoop, E. K.: Effects of progesterone treatment on concentrations of prostaglandins and oxytocin in plasma from the posterior vena cava of post-partum beef cows. J. Reprod. Fertil. **91**: 411-421 (1991).

Copelin, J.P., Smith, M.F., Garverick, H.A. and Youngquist, R.S.: Effect of the uterus on subnormal luteal function in anestrus beef cows. J. Anim. Sci. **64**: 1606-1511 (1987).

Copelin, J. P., Smith, M. F., Keisler, D. H. and Garverick, H. A.: Effect of active immunization of prepartum and post-partum cows against prostaglandin F<sub>2α</sub> on lifespan and progesterone secretion of short-lived corpora lutea. J. Reprod. Fert. **87**: 199-207 (1989).

Dailey, R.A., Butcher, R.L., Inskip, E.K. and Lewis, P.E.: Association of short luteal phases with follicular development in sheep and cows. Bulletin Agricultural and Forestry Experiment Station West Virginia University 1-16 (1992).

Diekman, M.A., O'Callaghan, p., Nett, T.M. and Niswender, G.D.: Validation of the methods and quantification of luteal receptors for LH throughout the estrous cycle and early pregnancy in ewes Biol. Reprod. **19**: 999-1009 (1978).

De Jong, F.H. Inhibin- Its nature, site of production and function. Oxford Reviews of Reproductive Biology **2**: 2-53. (1987).

De Wolff-Exalto, E.A.: Influence of gonadotrophins on early follicle cell development and early oocyte growth in the immature rat. J. Reprod. Fert. **66**: 537-542 (1982).

Donaldson, L.M. and Hansel, W.: Histological study of bovine corpora lutea. J. Dairy Sci. **48**: 905 (1965).

Driancourt, M.A., Bodin, L., Boomarov, O., Thimonier, J. and Elsen, J.M. : Number of mature follicles ovulating after a challenge of Human Chorionic Gonadotropin in different breeds of sheep at different physiological stages. J. Anim. Sci. **68**: 719-724 (1990)

Driancourt, M.A.: Follicular dynamics in sheep and cattle. Theriogenology **35**: 43-48 (1991).

Echternkamp, S.E. and Lunstra, D.D.: Causes for decreased fertility in out-of-season mated ewes. Theriogenology **10**: 65-69 (1978).

Edey, T.N., Kilgour, R. and Bremner, K.: Sexual behaviour and reproductive performance of ewe lambs at and after puberty. J. Agric. Sci. Camb. **90**: 83-91 (1978).

Farin, C.E., Moeller, C.L., Mayan, H., Gamboni, F., Sawyer, H.R. and Niswender, G.D.: Effect of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on cell populations in the ovine corpus luteum. Biol. Reprod. **38**: 413-421 (1988).

Findlay, J.K., Tsonis, C.G., Staples, L.D. and Cahill, N.P. Inhibin secretion by the sheep ovary. J. Reprod. Fert. **76**: 751-761 (1986).

Findlay, J. K., Robertson, D. M. and Clarke, L. J.: Influence of dose and route of administration of bovine follicular fluid and the suppressive effect of purified bovine inhibin (M, 31,000) on plasma FSH concentrations in ovariectomized ewes. J. Reprod. Fert. **80**: 455-461 (1987).

Findlay, J.K., Doughton, B., Robertson, D.M. and Forage, R.G.: Effects of immunization against recombinant bovine inhibin alpha subunit on circulating concentrations of gonadotrophins in ewes. J. Endocr. **120**: 59-65 (1989).

Findlay, J.K., Clarke, I.J., Luck, M.R., Rodgers and R.J.: Peripheral and intragonadal actions of inhibin-related peptides. J. Reprod. Fert. Suppl. **43**: 139-150 (1991).

Fitz, T.A., Mayan, M.H., Sawyer, H.R. and Niswender, G.D.: Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum Biol. Reprod. **27**: 703-711 (1982).

Flint, A.P.F., Sheldrick, E.L., Theodosis, D.T. and Wooding, F.B.P.: Ovarian peptides: role of luteal oxytocin in the control of the estrous cyclicity in ruminants. J. Anim. Sci. Suppl. **62**: 62-71 (1986).

Flint, A. F. P., Parkinson, T. J., Stewart, H. J., Vallet, J. L. and Lamming, G. E.: Molecular biology of trophoblast interferons and studies of their effects *in vivo*. J. Reprod. Fert., Suppl. **43**: 13-25 (1991).

Flores, G., Amezcua, R., Zarco, L., Ducoing, A. y Quispe, Q.: Pregnancy diagnosis by progesterone determination on day 18 post-service in the ewe. Comparison of radioimmunoassay and enzymeimmunoassay. Proceedings 12th International Congress on Animal Reproduction, The Hague, 45-47 (1992).

Gandolfi, F., Brevini, T. A. L., Modena, A. and Passoni, L.: Early embryonic signals: embryo-maternal interactions before implantation. Anim. Reprod. Sci. **28**: 269-276 (1992).

García-Winder, M., Lewis, P.E., Deaver, D.R., Smith, V.G., Lewis, G.S. and Inskeep, E.K.: Endocrine profiles associated with life span of induced corpora lutea in postpartum beef cows. J. Anim. Sci. **62**: 1352-1353 (1986).

García-Winder, M., Lewis, P. E., Townsed, E. C. and Inskeep, E. K.: Effects of norgestomet on follicular development in post-partum beef cows. J. Anim. Sci. **64**: 1099-1109 (1987).

Garverick, H.A. and Smith, M.F.: Mechanisms associated with subnormal luteal function. J. Anim. Sci. Suppl. **62**: 25-46. (1986).

Garverick, H.A. Zollers, W.G. and Smith, M.F. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal fuction. Anim. Reprod. Sci. **28**: 111-124 (1992a).

Garverick, H. A., Moser, M. T., Keisler, D. H., Hamilton, S. A., Roberts, R. M. and Smith, M. F.: Luteal function after intrauterine infusion of recombinant bovine interferon- $\alpha$ , into postpartum beef cows expected to have short or normal luteal phases. J. Reprod. Fert. **94**: 319-325 (1992b).

Geisert, R. D., Short, E. C., and Zavy, M. T.: Maternal recognition of pregnancy. Anim. Reprod. Sci. **28**: 287-298 (1992).

Ginther, O. J.: Response of corpora lutea to cauterization of follicles in sheep. Am. J. Vet. Res. **32**: 59-62 (1971).

Goodman, R.L. and Karsch, F.J.: Pulsatile secretion of luteinizing hormone: Differential suppression by ovarian steroids. Endocrinology **107**: 1286-1290 (1980).

Goodman, R.L., Bittman, E.L., Foster, D.L. and Karsch, F.J.: The endocrine basis of the synergistic suppression of luteinizing hormone by estradiol and progesterone. Endocrinology **109**: 1414-1417 (1981).

Gremmes, S.: Sekretionsmuster der Gonadotropine nach hormoneller intervention bei der stute. Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany. (1990).

Gutiérrez, A. C. G.: Comparación de la foliculogénesis y ciclos estrales de novillonas cebú y cebú-Holstein durante los meses de marzo a junio en el trópico húmedo de México. Tesis de Maestría. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., (1992).

Hackett, A.J. and Robertson, H.A.: Effect of dose and time of injection of prostaglandin F<sub>2α</sub> in cycling ewes. *Theriogenology* 13: 347-351 (1980).

Hage, A.J., Groen-Klevant, A.C. and Welschen, R.: Follicle growth in the immature rat ovary *Acta Endocrinol* 88: 375-382 (1978).

Hamada, T., Watanabe, G., Kokuho, T., Taya, K., Sasamoto, S., Hasegawa, W., Miyamoto, K. and Igarashi, M.: Radioimmunoassay of inhibin in various mammals. *J. Endocr.* 122: 697-704 (1989).

Hansel, W. and Convey, E.: Physiology of the estrous cycle. *J. Anim. Sci. Suppl* 2 57: 404-427 (1983).

Hansel, W., Alila, H.W., Dowd, J.P. and Milvae, R.A.: Differential origin and control mechanisms in small and large bovine luteal cells. *J. Reprod. Fert.*, 43: 77-89. (1991).

Hearnshaw, H., Restall, B.J. and Gleeson, R.: Observations on the luteolytic effects of prostaglandin F<sub>2α</sub> during the oestrous cycle and early pregnancy in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 32: 322-323 (1973).

Henderson, K.M., Franchimont, P., Charlet-Renard, Ch. and McNatty, K.P.: Effect of follicular atresia on inhibin production by bovine granulosa cells in vitro and inhibin concentrations in the follicular fluid. *J. Reprod. Fert.* 72: 1-8 (1984).

Henderson, K.M., Prisk, M.D., Hudson, N., Ball, K., McNatty, K.P., Lun, S., Heath, D., Kieboom, L.E. and McDiarmid, J.: Use of bovine follicular fluid to increase ovulation rate or prevent ovulation in sheep. *J. Reprod. Fert.* 76: 623-635 (1986).

Herrera, H., Feldman, S., Zarco, Q., Valencia, M., Ortiz, H. y Angeles C.: Evaluación del efecto luteolítico de la prostaglandina F<sub>2</sub> alfa en diferentes días del ciclo estral de la borrega. *Vet. Méx.* 21: 143-147 (1990).

Hixon, J. E. and Flint, A. P.: Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin F<sub>2α</sub> secretion in sheep. *J. Reprod. Fert.* 79: 457-467 (1987).

Holst, P.J. and Moore, N.W.: Control of oestrous and ovulation by progesterone and cronolone administered either intramuscularly or intravaginally and subsequent fertility. *Aust. J. Agric. Res.* 21: 371-382 (1970).

Hoyer, P.B. and Marion, S.L.: Influence of agents that affect intracellular calcium regulation on progesterone secretion in large and small luteal cells of the sheep. *J. Reprod. Fert.* 86: 445-455 (1989).

Hu, Y., Nephew, W., Pope, F. and Day, L.M.: Uterine influences on the formation of subnormal corpora lutea in seasonally anestrous ewes. *J. Anim. Sci.* 69: 2532-2537 (1991).

Hunter, M.G., Southee, J.A., McLeod, B.J. and Haresign, W.: Progesterone pretreatment has a direct effect on GnRH-induced preovulatory follicles to determine their ability to develop into normal corpora lutea in anoestrous ewes. *J. Reprod. Fert.* 76: 349-363 (1986).

- Hunter, M.G. and Southee, J.A.: Treatment with progesterone affects follicular steroidogenesis in anoestrous ewes. Anim. Reprod. Sci. **14**: 273 (1987).
- Hunter, M.G., Southee, J.A. and Lamming, G.E.: Fuction of abnormal corpora lutea *in vitro* after GnRH-induced ovulation in the anoestrous ewe. J. Reprod. Fert. **84**: 139-148 (1988).
- Hunter, M.G., Ayad, V.J., Gilbert, C.L., Southee, J.A. and Wathes, D.C.: Role of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  and oxytocin in the regression of GnRH-induced abnormal corpora lutea in anoestrous ewes. J. Reprod. Fert. **85**: 551- 561 (1989).
- Hunter, M.G.: Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. J. Reprod. Fert. Suppl. **43**: 91-99 (1991).
- Jacqueline, M., Wallace, J., Robinson, J.J. and Aitken, R.P.: Does inadequate function limit the establishment of pregnancy in the early post-partum ewe? . J. Reprod. Fert. **85**: 229-240 (1989).
- Karsch, F. J., Noveroske, J. W., Roche, H., Norton, W. and Nalbandov, A. B.: Maintenance of ovine corpora lutea in the absence of ovarian follicles. Endocrinology **87**: 1228-1236 (1970).
- Karsch, F.J., Legan, S.J., Ryan, K.D. and Foster, D.L.: Importance of estradiol and progesterone in regulating LH secretion and estrous behaviour during the sheep estrous cycle. Biol. Reprod. **23**: 404-413 (1980).
- Keister, D.H. and Keister, L.W.: Formation and function of GnRH-induced subnormal corpora lutea in cyclic ewes. J. Reprod. Fert. **87**: 265 (1989).
- Keister, D.H., Inskeep, E.K. and Dailey, R.A.: First luteal tissue in ewe lambs: Influence on subsequent ovarian activity and response to hysterectomy. J. Anim. Sci. **57**: 150-156 (1983).
- Kindahl, H.: Maternal recognition of pregnancy in ruminants: an "on-off mechanism" of prostaglandin release. Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, 586-589. (1994).
- Knight, P. G. and Castillo, R. J.: Effects of bovine follicular fluid on gonadotrophin secretion in intact and chronically ovariectomized ewes before and after desensitization of pituitary gonadotrophs to gonadotrophin-releasing hormone. J. Endocr. **117**: 431-439 (1988).
- Knight, P. G.: Identification and purification of inhibin and inhibin-related proteins. J. Reprod. Fert. Suppl. **43**: 111-123 (1991).
- Kretser, D.M. and Robertson, D.M. The isolation and physiology of inhibin and related proteins. Biol. Reprod. **40**: 33-47. (1989).
- Lamming, J.L., Vallet, J.L. and Flint, A.P.F.: Progestational control of endometrial oxytocin receptor determines cycle length in sheep. J. Reprod. Fert. Suppl. **43**: 53-54. (1991).
- Larson, G.H., Lewis, P.E., Dailey, R.A., Inskeep, E.K. and Townsend, E.C.: Follicle stimulating hormone pattern and luteal function in ewes receiving bovine follicular fluid during three stages of the estrous cycle. J. Anim. Sci. **64**: 1491-1497 (1987).

Larson, G.H., Mallory, D.S., Dailey, R.A. and Lewis, P.E. Gonatropins concentrations, follicular development, and luteal function in pituitary stalk-transected ewes treated with bovine follicular fluid. J. Anim. Sci. **69**: 4104-411. (1991).

Lau, T. M., Gow, C. B. and Fairclough, R. J.: Increases in the oxytocin-induced prostaglandin F2 $\alpha$  response and reduction in the concentrations of endometrial oxytocin receptors in ewes in response to progesterone. J. Reprod. Fert. **95**: 11-18 (1992).

Lau, T.M., Kerton, D.J., Gow, C.B. and Fairclough, R.J.: Role of progesterone in the control of endometrial oxytocin receptors at luteolysis in sheep. J. Reprod. Fert. **98**: 229-233 (1993).

Leaman, D. W. and Roberts, R. M.: Genes for the trophoblast interferons in sheep, goat and musk ox and distribution of related genes among mammals. J. Interferon Res. **12**: 1-11 (1992).

Lutz, S. L., Smith, M. F., Keisler, D. H. and Garverick, H. A.: Effect of constant infusion of oxytocin on luteal lifespan and oxytocin-induced release of prostaglandin F2 $\alpha$  in heifers. Dom. Ani. Endo. **8**: 573-585 (1991).

Manns, J.G., Humphrey, W.D., Flood, P.F., Mapletoft, R.J., Rawlings, N.C. and Cheng K.W.: Endocrine profiles and functional characteristics of corpora lutea following onset of post partum ovarian activity in beef cows. Can. J. Anim. Sci. **63**: 331-347 (1983).

Mann, G.E., Campbell, B.K., McNeilly, A.S. and Baird, D.T.: Effects of passively immunizing ewes against inhibin and oestradiol during the follicular phase of the oestrous cycle. J. Endocr. **125**: 417-424 (1990).

Mann, G.E., McNeilly, A.S. and Baird, D.T.: Hormone production in vivo and in vitro from follicles at different stages of the oestrous cycle in the sheep. J. Endocr. **132**: 225-234. (1992a).

Mann, G.E., Campbell, B.K., McNeilly, A.S. and Baird, D.T.: The role of inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. J. Endocr. **133**: 381-391 (1992b).

Martin, G.B., Taylor, P.L. and McNeilly, A.S.: Effect of small doses of bovine follicular fluid on the tonic secretion of gonadotrophins in the ewe. J. Endocr. **114**: 73-79 (1987).

Martin, G.B., Price, C.A., Thiery, J.C., Webb, R.: Interaction between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotrophins in the ewe. J. Reprod. Fert. **82**: 319-328 (1988).

McCracken, J.A., Scharamm, W., Barcikowski, B. and Wilson, L.: The identification of prostaglandin F2 alpha as a uterine luteolytic hormone and the hormonal control of its synthesis. Acta. Vet. Scand. Suppl. **77**: 77-88 (1981).

McCracken, J. A., Schams, W. and Okulicz, W. C.: Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF2 $\alpha$  from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation during early pregnancy. Anim. Reprod. Sci. **7**: 31-55 (1984).

McLeod, B.J., Haresing, W. and Lamming, G.E.: Response of seasonally anoestrous ewes to small-dose multiple injection of GnRH without progesterone pre-treatment. J. Reprod. Fert. **65**: 223-230 (1982a).

McLeod, B.J., Haresing, W. and Lamming, G.E.: The induction of ovulation and luteal function in seasonally anoestrous ewes treated with small-dose multiple injection of GnRH. J. Reprod. Fertil. **65**: 215-221 (1982b).

McLeod, B.J. Haresing, W.: Evidence that progesterone may influence subsequent luteal function in the ewe by modulating pre-ovulatory follicle development. J. Reprod. Fertil. **71**: 381-386 (1984).

McLeod, B.J. and Mc Neilly, A.S.: Suppression of plasma FSH concentrations with bovine follicular fluid blocks ovulation in GnRH-treated seasonally anoestrous ewes. J. Reprod. Fert. **81**: 187-194 (1987).

McLeod, B.J. and McNeilly, A.S.: Manipulation of plasma FSH concentrations by administration of bFf affects LH secretion in seasonally anoestrous ewes. Anim. Reprod. Sci. **25**: 115-124 (1991).

McNatty, K.P., Dobson, C., Gibb, M., Kieboom, L. and Thurley, D.C.: Accumulation of luteinizing hormone, oestradiol and androstenedione by sheep ovarian follicles *in vivo*. J. Endocr. **91**: 99-109 (1981a).

McNatty, K.P. Gibb, M., Dobson, C., Thurley, D.C. and Findlay, J.K.: Changes in the concentration of gonadotrophic and steroidal hormones in the antral fluid of ovarian follicles throughout the oestrous cycle of the sheep. Aust. J. Biol. Sci. **34**: 67-80 (1981b).

McNatty, K.P., Hudson, N., Gibb, M., Ball, K., Fannin, J., Kieboom, L. and Thurley, D.C.: Effects of long-term treatment with LH on induction of cyclic ovarian activity in seasonally anoestrous ewes. J. Endocr. **100**: 67-73 (1984).

McNatty, K.P., Hudson, N., Gibb, M., Ball, K., Henderson, K.M., Heath, D.A., Lun, S. and Kieboom, L.E.: FSH influences follicle viability, oestradiol biosynthesis and ovulation rate in Romney ewes. J. Reprod Fert. **75**: 121-131 (1985).

McNeilly, A.S.: Prolactin and the control of gonadotrophin in the female. J. Reprod. Fert. **58**: 537-549 (1980).

McNeilly, A.S., Swanston, I.A., Crow, W., Tsonis, C.G. and Baird D.T.: Changes in the plasma concentrations of inhibin throughout the normal sheep oestrous cycle and after the infusion of FSH. J. Endocr. **120**: 295-305 (1989a).

McNeilly, A.S. and Baird, D.T.: Episodic secretion of inhibin into the ovarian vein during the follicular phase of the oestrous cycle in the ewe. J. Endocr. **122**: 287-292 (1989b).

McNeilly, A. S., Picton, H. M., Campbell, B. K. and Baird, D. T.: Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. J. Reprod. Fert. Suppl. **43**: 177-186 (1991a).

McNeilly, A.S., Crow, W. and Campbell, B.K.: Effect of follicular fluid and inhibin immunoneutralization on FSH-induced preovulatory follicle growth in the ewe. J. Endocr. **131**: 401-409 (1991b).

Medhamurthy, R., Carruthers, T.D. and Manns, J.G.: Effects of bovine follicular fluid inhibin on serum gonadotrophin concentrations in ewes during oestrous. J. Reprod. Fert. **81**: 91-98 (1987).

Mejía, V. O. : Efecto del líquido folicular equino en la sobrevivencia de embriones ovinos transferidos asincrónicamente. Tesis de Maestría en Producción Animal (Reproducción). Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., (1995).

Miquelajauregüi, M. E.: Efecto de la inhibina o flunixin-meglumine (Finadine) sobre la luteólisis en ovejas. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., (1993).

Miller, K.F., Critser, J.K., Rowe, R.F. and Ginther, O.J.: Ovarian effects of bovine follicular fluid treatment in sheep and cattle. Biol. Reprod. 21: 537-544 (1979a).

Miller, K.F., Wesson, J.A. and Ginther, O.J.: Changes in concentrations of circulating gonadotropins following administration of equine follicular fluid to ovariectomized mares. Biol. Reprod. 21: 867-872 (1979b).

Moore, L.G., Choy, V.J., Elliot, R.L. and Watkins, W.B.: Evidence for pulsatile release of ovarian oxytocin during luteolysis in the ewe. J. Reprod. Fert. 76: 159-166 (1986).

Muldoon, T.G. : Regulation of steroid hormone receptor activity. Endoc. Rev. 1: 339-364 (1980).

Newton, G. R., Martinod, S., Hansen, P. J., Thatcher, W. W., Siegenthaler, B., Gerber, C. and Voiroi, M. J.: Effect of bovine interferon on acute changes in body temperature and serum progesterone concentration in heifers. J. Dairy Sci. 73: 3439-3448 (1990).

Niswender, G.D., Schwall, R.H., Fitz, T.A., Farin, C.E. and Sawyer, H.R.: Regulation of luteal function in domestic ruminants: New Concepts. Recent Proc. Horm. Res. 41: 101-102 (1985).

Niswender, G.D., Juengel, J.L., McGuire, W.J., Belfiore, C.J. and Wiltbank, M.C. : Luteal function: the estrus cycle and early pregnancy. Biol. Reprod. 50: 239-247 (1994).

Odensvik, K. and Gustafsson, H.: Effect of flunixin during asynchronous embryo transfer in the heifer. Anim. Reprod. Sci. 36: 13-24 (1994).

Oldham, C. M. and Martin, G. B.: Stimulation of seasonally anovular Merino ewes by rams. II. Premature regression of ram induced corpora lutea. Anim. Reprod. Sci. 1: 291-295 (1979).

Ott, T. L., Mirando, M. A., Davis, M. A. and Bazer, F. W.: Effects of ovine conceptus secretory proteins and progesterone on oxytocin-stimulated endometrial production of prostaglandin and turnover of inositol phosphate in ovariectomized ewes. J. Reprod. Fert. 95: 19-20 (1992).

O'Shea, J. D., Rodgers, R. J. and Wright, P. J.: Morphometric analysis and function *in vivo* and *in vitro* of corpora lutea from ewes treated with LHRH during seasonal anestrus. J. Reprod. Fert. 72: 75-85 (1984).

O'Shea, J. D., Rodgers, R. J. and Wright, P. J.: Cellular composition of the sheep corpus luteum in the mid-and late luteal phases of the estrous cycle. J. Reprod. Fert. 76: 685-691 (1986).

Parkinson, T. J., Lamming, G. E., Flint, A. P. F. and Jenner, L. J.: Administration of recombinant bovine interferon- $\alpha_1$  at the time of maternal recognition of pregnancy inhibits prostaglandin F $_{2\alpha}$  secretion and causes luteal maintenance in cyclic ewes. J. Reprod. Fert. 94: 489-500 (1992).

Peter, A. T., Bosu, W. T. U., Liptrap, R. M. and Cumming, E.: Temporal changes in serum prostaglandin F2 $\alpha$  and oxytocin in dairy cows with short luteal phases after the first postpartum ovulation. Theriogenology **32**: 277-284 (1989).

Poyser, N.L.: Prostaglandin production by the uterus of the non-pregnant and early pregnant guinea-pig. Anim. Reprod. Sci. **7**: 1-30 (1984).

Pulido, A., Zarco, C. S., Galina, C., Murcia, C., Flores, G. and Posadas, E.: Progesterone metabolism during storage of blood samples from Gyr cattle: Effects of anticoagulant, time and temperature of incubation. Theriogenology **35**: 965-975 (1991).

Putney, D. J., Malayer, J. R., Gross, T. S., Thatcher, W. W., Hansen, P. J. and Drost, M.: Heat stress-induced alterations in the synthesis and secretion of proteins and prostaglandins by cultured bovine conceptuses and uterine endometrium. Biol. Reprod. **39**: 717-728 (1988).

Qurke, J.F.: Regulation of puberty and reproduction in female lambs: A Review. Livestock Production Science **8**: 37-53 (1981).

Qurke, J.F., Stabenfeldt, G.H. and Bradford, G.E.: Onset of puberty and duration of the breeding season in Suffolk, Rambouillet, Finnish Landrace, Dorset and Finn-Dorset ewe lambs. J. Anim. Sci. **60**: 1463-1471 (1985).

Qurke, S.M. and Fortune, J.E.: Plasma concentrations of gonadotrophins, preovulatory follicular development and luteal function associated with bovine follicular fluid-induced delay of oestrus in heifers. J. Reprod. Fert. **76**: 609-621 (1986).

Quispe, T.L. Estudios sobre el uso del acetato de melengestrol para la sincronización e inducción de estros en ovejas. Tesis de Doctorado en Producción Animal. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., (1989).

Radford, H.M., Avenell, J.A. and Szell, A.: Human chorionic gonadotrophins induces multiple ovulation in sheep. In Reproduction in sheep 342-344 (1984).

Ramírez-Godínez, J. A., Kiracofe, G. H., McKee, R. M., Schalles, R. R. and Kittok, R. J.: Reducing the incidence of short cycles in beef cows with norgestomet. Theriogenology **15**: 613-623 (1981).

Rivier, C., Roberts, V. and Vale, W.: Possible role of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in modulating inhibin secretion and expression during the estrous cycle of the rat. Endocrinology **125**: 876-882 (1989).

Roberts, R. M.: Conceptus interferons and maternal recognition of pregnancy. Biol. Reprod. **40**: 449-452 (1989).

Robertson, D. M., Foulds, M. L., Leversha, M., Morgan, F. J., Hearn, M. T. W., Burger, H. G., Wettenhall, R. E. H. and de Kretser, D. M.: Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. Biochem. Biophys. Res. Commun. **126**: 220-226 (1985).

Robertson, D.M., Farnworth, P.G., Clarke, L., Jacobsen, J., Cahir, N.F., Burger, H.G. and de Kretser, D.M.: Effects of bovine 35 kDa FSH-suppressing protein on FSH and LH in rat pituitary cells in vitro: comparison with bovine 31 kDa inhibin. J. Endocr. **124**: 417-423 (1990).

Rodríguez, M.R. Efecto de la suplementación sobre el inicio de la actividad reproductiva de la oveja tabasco o pelibuey. Tesis de Doctorado en Producción Animal. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., (1991).

Romero, M.C., Damian, P.M., Lueje, V. y Morato, T.: Perfil estral de progesterona en ovejas. Vet. Méx. 20: 27-32 (1989).

Roser, J.F., McCue, P.M. and Hoye, E.: Inhibin activity in the mare and stallion. Dom. Anim. Endo. 11 (1): 87-100 (1994).

Sato, E., Ishibashi, T. and Iritani, A.: Purification and action sites of a follicle stimulating hormone inhibitor from follicular fluid. J. Anim. Sci. 55: 873-877 (1982).

Scaramuzzi, R.J., Tillson, S.A., Thorneycroft, I.H. and Caldwell, B.V.: Action of exogenous progesterone and estrogen on behaviour estrus and luteinizing hormone levels in the ovariectomized ewe. Endocrinology 88: 1184-1189 (1971).

Scaramuzzi, R.J., Adams, N.R., Baird, D.T., Campbell, B.K., Downing, J.A., Findlay, J.K., Henderson, K.M., Martin, K.P., McNatty, K.P., McNeilly, A.S. and Tsonis, C.D.: A model for follicle secretion and the determination of ovulation rate in the ewe. Reprod. Fert. Dev. 5: 459-478 (1993).

Schindler, H. and Amir, D.: The conception rate of ewe in relation to sperm dose and time of insemination. J. Reprod. Fert. 34: 191-196 (1973).

Short, R.E., Staigmiller, R.B. and Bellows, R.A.: Hormonal treatments to induce ovulation. In: 11th. International Congress Animal Reproduction and Artificial Insemination. Dublin Irlanda. 5: 146-154 (1988).

Silvia, W.J., Lewis, G.S., McCracken, J.A., Thatcher, W.W. and Wilson, Jr., L.: Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  during luteolysis in ruminants. Biol. Reprod. 45: 655-663 (1991).

Silvia, W.J. and Raw, R.E., Aldrich, S.L. and Hayes, S.L.: Uterine secretion of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  in response to oxytocin in ewes: Changes during the oestrous cycle and early pregnancy. Biol. Reprod. 85: 11-15 (1992).

Silvia, W.J. and Raw, R.E.: Regulation of pulsatile secretion of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  from the ovine uterus by ovarian steroids. J. Reprod. Fert. 98: 341-347 (1993).

Southee, J. A., Hunter, M. G. and Haresign, W.: Function of abnormal corpora lutea *in vivo* after GnRH induced ovulation in the anoestrus ewe. J. Reprod. Fert. 84: 131-137 (1988a).

Southee, J.A. Hunter, M.G., Law, A.S. and Haresign, W.: Effect of hysterectomy on the short life-cycle corpus luteum produced after GnRH-induced ovulation in the anoestrus ewe. J. Reprod. Fert. 84: 149-155 (1988b).

Taya, K., Kaneko, H., Watanabe, G. and Sasamoto, S.: Inhibin and secretion of FSH in oestrous cycles of cows and pigs. J. Reprod. Fert. 43: 151-162 (1991).

Thatcher, W. W., Bazer, F. W., Sharp, D. C. and Roberts, R. M.: Interrelationship between uterus and conceptus to maintain corpus luteum function during early pregnancy: sheep, cattle, pig and horses. J. Anim. Sci. 67 (Suppl. 2): 47-61 (1986).

Thatcher, W. W., Hansen, P. J., Gross, T. S., Helmer, S. D., Plante, C. and Bazer, F. W.: Antiluteolytic effects of bovine trophoblast protein-1. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **37**: 91-99 (1989).

Troxel, T. R. and Kesler, D. J.: Ability of indomethacin to alter prostaglandin metabolite concentrations and to enhance luteal function of corpora lutea induced in post-partum suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* **59**: 177-181 (1984).

Tsonis, C.G., Quigg, H., Lee, V.W.K., Leversha, L., Trounson, A.O. and Findlay, J.K.: Inhibin in individual ovine follicles in relation to diameter and atresia. *J. Reprod. Fert.* **67**: 83-90. (1983).

Tsonis, G.C., Carson, R.S. and Findlay, J.K.: Relationships between aromatase activity, follicular fluid oestradiol-17 $\beta$  and testosterone concentrations, and diameter and atresia of individual ovine follicles. *J. Reprod. Fert.* **72**: 153-163 (1984).

Vallet, J.L., Lamming, G.E. and Batten, M.: Control of endometrial oxytocin receptor and uterine response to oxytocin by progesterone and oestradiol in the ewe. *J. Reprod. Fert.* **90**: 625-634 (1990).

Vallet, J. L., Lamming, G. E. and Batten, M.: Control of endometrial oxytocin receptor and uterine response to oxytocin by progesterone and oestradiol in the ewe. *J. Reprod. Fert.* **90**: 625-634 (1991).

Wakeling, A.E. and Green, L.R.: Corpus luteum prostaglandin receptors and luteolysis. *Acta Vet. Scand. Suppl.* **77**: 131-142 (1981).

Walton, J. S., McNeilly, J. R., McNeilly, N. S. and Cunningham, F. J.: Changes in concentrations of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin and progesterone in the plasma of ewes during the transition from anoestrus to breeding activity. *J. Endocr.* **75**: 127-136 (1977).

Wallace, J.M., McNeilly, A.S. and Baird, D.T.: Ovulation rate and embryo survival in Damline ewes after treatment with bovine follicular fluid in the luteal phase of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.* **75**: 101-109 (1985).

Wathes, D.C. and Denning-Kendall, P.A.: Control of synthesis and secretion of ovarian oxytocin in ruminants. *J. Reprod. Fert.* **45**: 39-52 (1992).

Webb, R., England, B.G. and Fitzpatrick, K.E.: Control of the preovulatory gonadotrophin surge in the ewe. *Endocrinology* **108**: 1178-1185 (1981).

Webb, R. and England, B.G.: Relationship between LH receptor concentrations in thecal and granulosa cells and in-vivo and in-vitro steroid secretion by ovine follicles during the preovulatory period. *J. Reprod. Fert.* **66**: 169-180 (1982).

White, L. M., Keisler, D. H., Dailey, R. A. and Inskeep, E. K.: Characterisation of ovine follicles destined to form subfunctional corpora lutea. *J. Anim. Sci.* **65**: 1595-1601 (1987).

Wiltbank, M.C. and Niswender, G.D.: Functional aspects of differentiation and degeneration of the steroidogenic cells of the corpus luteum in domestic ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* **28**: 103-119 (1992).

Zarco, L., Stabenfeldt, G. H., Kindahl, H., Quirke, J. F. and Granstrom, E.: Persistence of luteal activity in the non-pregnant ewe. *Anim. Reprod. Sci.* **7**: 245-267 (1984).

Zarco, Q.L., Stabenfeldt, G.H., Quirke, J.F., Kindahl, H. and Bradford, G.E. 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 (1988a).

Zarco, L., Stabenfeldt, G. H., Basu, S., Bradford, G. E. and Kindahl, H.: Modification of prostaglandin F2 $\alpha$  synthesis and release in the ewe during the initial establishment of pregnancy. J. Reprod. Fert. **83**: 527-536 (1988b).

Zhang, J., Weston, P.G. and Hixon, J.E.: Influence of estradiol on the secretion of oxytocin and prostaglandin F2a during luteolysis in the ewe. Biol. Reprod. **45**: 395-403 (1991).

Zhang, J., Weston, P. G. and Hixon, J. E.: Role of progesterone and oestradiol in the regulation of uterine oxytocin receptors in ewes. J. Reprod. Fert. **94**: 395-404 (1992).

Zollers, Jr., W. G., Garverick, H. A. and Smith, M. F.: Oxytocin-induced release of prostaglandin F2 $\alpha$  in postpartum beef cows: Comparison of short versus normal luteal phases. Biol. Reprod. **41**: 262-267 (1989).

Zollers, Jr., W. G., Garverick, H. A., Youngquist, R. S., Ottobre, J. S., Silcox, R. W., Copelin, J. P. and Smith, M. F.: In vitro secretion of prostaglandins from endometrium of postpartum beef cows expected to have short or normal luteal phases. Biol. Reprod. **44**: 522-526 (1991).

Zollers, Jr., W.G., Garverick, H.A., Smith, M.F., Moffatt, R.J., Salfen, B.E. and Youngquist, R.S.: Receptor concentrations for progesterone and oxytocin in endometrium of post-partum cows expected to have a short or normal oestrous cycle. J. Reprod. Fert. suppl 1: (1992).