



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**Y**

**ZOOTECNIA**

**MONITOREO DE LA GLÁNDULA LÚTEA EN YEGUAS CON  
GESTACIONES MULARES ANTES, DURANTE Y POSTERIOR  
AL TRATAMIENTO CON PROGESTÁGENOS.**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A:

**JOSÉ HELÍ DE JESÚS RUIZ GUERRA**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA MYRIAM BOETA ACOSTA

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

*A mamá y papá*

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Con amor y respeto a la Universidad Nacional Autónoma de México sede de cultura y ciencia inagotables que brinda la generosa oportunidad de aprender y adquirir el conocimiento en las diversas disciplinas.

A todos los maestros de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia que con esmero y conocimiento colaboraron en mi formación.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Con esmero y dedicación a la distinguida Dra. Myriam Boeta que gentilmente me auxilió en la dirección de este trabajo.

A Susana Rojas, Anita Rodríguez y Clara Murcia, por el apoyo en las determinaciones hormonales en el laboratorio.

A todas aquellas personas que de alguna manera con sus sólidas experiencias me ayudaron en la realización de este trabajo y a mi constante formación, especialmente al MVZ José Antonio Esquivel y MVZ Carlos Castro.

A mis entrañables amigos que con sus ánimos y consejos me empujaron a concluir esta tesis y sobretodo a los más cercanos: Manuel, Edgar, Daniel, German, Mariana, Raul, Eli, Ali, Fer y Cecilia, por esto y ¡ por lo que nos falta!

A mis tíos Juan y Gloria y a mis primos: Pepe, Pilar, Juan, Ociel, Octavio y Didier por su confianza y buen consejo.

Con mucho cariño a mis hermanos Jocabed, Jeleb, Obed y Betsabé por su ejemplo y ayuda.

## CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	IX
SUMMARY.....	X
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>4</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>4</b>
<b>4. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
<b>4.1 CICLO ESTRAL.....</b>	<b>5</b>
4.1.1 FASE FOLICULAR.....	5
4.1.2 OVULACIÓN.....	9
4.1.3 FASE LÚTEA.....	10
<b>4.1.3.1 Luteinización y formación de la glándula lútea.....</b>	<b>10</b>
<b>4.1.3.2 Conformación de la glándula lútea.....</b>	<b>11</b>
<b>4.1.3.3 Regulación de la función lútea.....</b>	<b>12</b>
<b>4.1.3.4 Síntesis de progesterona por células lúteas.....</b>	<b>13</b>
<b>4.1.3.5 Funciones de la progesterona.....</b>	<b>14</b>
<b>4.1.3.6 Vascularidad de la glándula lútea.....</b>	<b>15</b>
<b>4.1.3.7 Luteólisis.....</b>	<b>16</b>
<b>4.2 EVALUACIÓN ULTRASONOGRÁFICA DE LA GLÁNDULA LÚTEA.....</b>	<b>17</b>
<b>4.3 TERMINOLOGÍA DE LA GLÁNDULA LÚTEA.....</b>	<b>18</b>
<b>4.4 FISIOLÓGÍA DE LA GESTACIÓN TEMPRANA.....</b>	<b>19</b>
4.4.1 RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA GESTACIÓN.....	19
4.4.2 FUNCIÓN LÚTEA DURANTE LA GESTACIÓN TEMPRANA.....	20

4.4.3 ENDOCRINOLOGÍA DE LA GESTACIÓN.....	21
4.4.4 RESURGENCIA DE LA GLÁNDULA LÚTEA PRIMARIA.....	21
4.4.5 GLÁNDULAS LÚTEAS SUPLEMENTARIAS.....	22
4.4.6 COPAS ENDOMETRIALES.....	22
<b>4.5 GESTACIÓN MULAR .....</b>	<b>26</b>
<b>4.6 PROGESTÁGENOS EXÓGENOS .....</b>	<b>27</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>5.1 Localización.....</b>	<b>29</b>
<b>5.2 Animales y grupo experimental.....</b>	<b>29</b>
<b>5.3 Muestreo sanguíneo y procesamiento de muestras.....</b>	<b>31</b>
<b>5.4 Análisis estadístico.....</b>	<b>32</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>46</b>
9. ANEXO- PERFILES HORMONALES Y MEDIDAS LÚTEAS NO INCLUIDAS EN EL CAPÍTULO 6.....	47
9.1 Yeguas grupo experimental.....	49
9.2 Yeguas grupo testigo.....	60
<b>10. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>73</b>

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

		Página
Figura 1	Terminología de la glándula lútea durante el ciclo estral y gestación temprana. Modificado de Ghinther OJ: Reproductive Biology of the mare: Basic and applied aspects, 2nd edition, Cross Plains, Wisconsin, Equiservicios, 1992.	18
Figura 5.1	Diagrama que muestra las actividades llevadas a cabo durante el trabajo de campo en ambos grupos de animales. Dx Gx = Diagnóstico de gestación, Tx = Tratamiento con altrenogest.	30,31
Figura 6.1	Figura 6.1 Concentraciones de progesterona en gestaciones con embrión mula, que durante el periodo de estudio acumularon 2,3 ó 4 glándulas lúteas. Las barras representan la media $\pm$ el error estándar. La flecha indica el día promedio de la aparición de la primera glándula lútea suplementaria. La zona sombreada representa la duración del tratamiento.	33
Figura 6.2	Porcentaje de aparición de la glándula lútea secundaria durante el periodo que se administró el altrenogest.	34
Figura 6.3	Número de yeguas que acumularon 1,2, 3 ó 4 glándulas lúteas durante los primeros 120 días de gestación.	34
Figura 6.4	Diámetro promedio de la glándula lútea y concentraciones de progesterona presentadas entre los 7 y 35 en yeguas gestantes con embrión mula. Las barras representan el error estándar.	35
Figura 6.5	Concentraciones de progesterona del día 35 al 120 de la gestación en yeguas gestantes con feto mula, tratadas o sin tratar con altrenogest. Las barras representan la media $\pm$ el error estándar. La zona sombreada representa la duración del tratamiento con altrenogest. Las diferencias entre grupos no son significativas ( $p>0.05$ ).	36
Figura 6.6	Concentraciones de progesterona en yeguas gestantes con feto mula, tratadas o sin tratar con altrenogest. Las barras representan la media $\pm$ el error estándar. Dentro de cada grupo, los valores que no comparten por lo menos una literal son estadísticamente diferentes ( $p<0.05$ ).	37
Figura 6.7	Diámetro promedio de la glándula lútea primaria entre el 14 y 120 días de gestación en yeguas con feto mula, tratadas o sin	38



tratar con altrenogest . Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar. La zona sombreada la duración del tratamiento con altrenogest. Las diferencias entre grupos no son significativas ( $p>0.05$ ).

Figura 6.8	Diámetro de la glándula lútea primaria entre el día 14 al 120 de gestación de yeguas con feto mula. Las barras representan la media $\pm$ el error estándar. En el grupo experimental los valores que no comparten al menos una literal son significativamente diferentes ( $p<0.05$ ). En el grupo testigo las diferencias entre semanas no son significativas ( $p>0.05$ ).	39
Figura 6.9	Regresión lineal que muestra los diámetros sumados de las glándulas lúteas que presentan cada yegua y las concentraciones de progesterona en yeguas gestantes con feto mula tratadas o sin tratar con altrenogest.	40
Figura 6.10	Número en promedio de glándulas lúteas que se acumularon en gestaciones con feto mula en yeguas tratadas o sin tratar con altrenogest. Las barras representan la media $\pm$ el error estándar.	41
9.1	Anexo- de graficas con perfiles hormonales y medidas lúteas no incluidas en el cuerpo del capítulo 6.	47
9.2	Yeguas del grupo experimental	49
9.3	Yeguas grupo testigo	60

## RESUMEN

**Monitoreo de la glándula lútea en yeguas con gestaciones mulares antes, durante y después al tratamiento con progestágenos.** Ruiz J.H., Boeta A.M. El objetivo del presente trabajo fue el monitoreo la glándula lútea mediante la medición de su diámetro, las concentraciones séricas de progesterona, número de glándulas lúteas acumuladas y relacionar el tamaño de la/las glándulas lúteas con la presencia de progesterona en plasma entre el día de la ovulación (Día 0) y el día 120 de la gestación en yeguas inseminadas con burro para evaluar el efecto del tratamiento con el progestágeno exógeno altrenogest. Se evaluaron 24 yeguas inseminadas con burro y divididas al azar en dos grupos: Yeguas del grupo control ó yeguas sin tratamiento (n= 13) y yeguas del grupo experimental ó bajo tratamiento con altrenogest (n=11), a las cuales se les administró altrenogest a una dosis de 0.088mg/kg cada 24 horas, en el periodo que comprende del día 35 al día 70 de la gestación mular, tipo de gestación que normalmente se producen bajas cantidades de la hormona eCG. Se recolectaron muestras de sangre dos veces por semana desde el día sexto post-ovulación hasta los primeros 35 días de la gestación para posteriormente realizar los muestreos tres veces por semana del día 36 hasta el día 120 de la gestación. Se realizaron tres estudios ultrasonográficos a la semana para determinar el número y el diámetro de la/las glándulas lúteas. El plasma se separo del paquete celular mediante la centrifugación a 3,000 rpm durante 10 minutos. El plasma se mantuvo congelado a -20°C, hasta el momento de realizar los análisis para las determinaciones hormonales en el laboratorio de endocrinología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. Para la determinación de las concentraciones de progesterona se utilizó un radioinmunoanálisis de fase sólida, empleando el kit Coat-A-Count®. Antes del tratamiento ó durante los primeros 35 días de gestación. Tanto para la progesterona como para el diámetro de la glándula lútea se realizó una prueba de Anova de una vía, para detectar las diferencias, durante dicho periodo no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los dos parámetros. Se realizaron análisis de medidas repetidas durante y posterior al tratamiento con la finalidad de ver si existían diferencias entre concentraciones plasmáticas de progesterona y diámetro de la glándula lútea del grupo control y del grupo experimental a lo largo del tiempo. Las concentraciones plasmáticas de progesterona entre el día 35 y 120 de la gestación no fueron estadísticamente significativas entre grupos ( $F = 0.1126$ ;  $P = 0.129$ ). En el caso de encontrar diferencias significativas se realizaron pruebas pos doc. ( $t$  de student). Sin embargo, se detectaron diferencias significativas durante este periodo, independientemente de a qué grupo pertenecen ( $F = 19.69$ ;  $P < 0.0001$ ). Se observa que las concentraciones de la progesterona para ambos grupos comienzan a elevarse a partir del día 35. Se encontró una relación positiva entre la progesterona y el tamaño de la/las glándulas lúteas para el grupo experimental y control, ( $F = 13.41$ ;  $P = 0.0052$ ), ( $F = 13.53$ ;  $P = 0.003$ ) respectivamente. Durante el tratamiento el 84% de las yeguas del grupo control formaron la glándula lútea secundaria mientras solo el 18% del grupo experimental formó la glándula lútea secundaria en este periodo. En el grupo control el número promedio de glándulas lúteas acumuladas fue 0.6 veces mayor ( $2.46 \pm 0.18$ ) que en el grupo experimental (ó con altrenogest) ( $1.53 \pm 0.18$ ) ( $t = 3.56$ ;  $P = 0.001$ ). Los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza fueron probados en todos los casos. Todos los análisis fueron realizados en el programa JMP (Ver. 6).

**Palabras Clave:** gestación mular, glándula lútea, altrenogest, progesterona.

## SUMMARY

**Monitoring the luteal gland in pregnant mares with mule embryo before, during and after progestagen treatment.** Ruiz J.H., Boeta A.M. The objective of the present study was to monitor the luteal gland through cross-sectional line measurement, plasma progesterone concentrations, number of accumulated luteal glands and to relate its size with the presence of plasma progesterone within ovulation (Day 0) to day 120 of pregnancy with mule embryo to evaluate the effect of progestagen treatment (altrenogest). Thirty mares inseminated with donkey semen were randomly divided in two groups: the control group was constituted by mares without treatment (n=15), and the experimental group, constituted by mares administrated with altrenogest (n=15), which were administrated with at 0.088mg./kg. daily, from day 35 to 70 day of pregnancy with mule embryo, a type of pregnancy that generally produces low concentrations of eCG. Blood samples were taken by jugular venipuncture twice a week from day 6 to day 35 and later these were taken three times a week until day 120 of pregnancy. Three ultrasonographic examinations were carried out weekly to determine the number and the cross-sectional line of the luteal glands. Plasma was separated by centrifugation at 3000 rpm. during 10 minutes. It was kept frozen at -20 Celsius degrees, until hormonal determination analysis were made in the endocrinology laboratory at U.N.A.M.'s F.M.V.Z. Plasma progesterone concentrations were determined using a single antibody RIA kit (Coat-a-Count®). Before the treatment or during the first 35 days of pregnancy a one way Anova test was done for the progesterone as for the cross sectional line of the gland in order to detect differences, which were not found during that period in none of the two parameters. Analysis of variance for repeated measures was used during and after the treatment to identify differences of plasma progesterone concentration and cross-sectional line of the gland between control and experimental groups. Plasma progesterone concentration through day 35 to 120 were not statistically significant among groups (F=0.1126; P= 0.129). When significant differences were detected pos doc test was used (*t* of student). However, important differences were detected during this period regardless of the group (F= 19.69; P<0.001). Progesterone concentrations increased since day 35 in both groups. A positive relation between progesterone and the size of the gland was found for the experimental and control group, (F= 13.41; P= 0.0052), (F=13.53; P= 0.003) respectively. During treatment 84% of the mares in the control group formed a secondary luteal gland against only 18% of the experimental group. Among control group, accumulated luteal glands averaged 0.6 times ( $2.46 \pm 0.18$ ) the experimental group ( $1.53 \pm 0.18$ ) ( $t = 3.56$ ; P= 0.001). The normality and heterogeneity assumptions of variance were probed in every case. All analysis were done with JMP software. (Ver 6.)

**Keywords:** mule pregnancy, corpora lutea, altrenogest, progesterone.

# **MONITOREO DE LA GLÁNDULA LÚTEA EN YEGUAS CON GESTACIONES MULARES ANTES, DURANTE Y POSTERIOR AL TRATAMIENTO CON PROGESTÁGENOS.**

## **1. INTRODUCCIÓN**

El cuerpo lúteo es considerado una glándula temporal, encargada de mantener la gestación durante los primeros 120 días mediante la producción de progesterona (Stocco *et al.*, 2007).

La hormona luteinizante (LH), sintetizada en la pituitaria anterior, es esencial para su buen desarrollo y funcionamiento (Niswender *et al.*, 2000). La formación de esta estructura comienza con la ruptura de la pared del folículo preovulatorio y una disminución en el tamaño del antro asociada con pérdida del fluido folicular dentro de la bursa ovárica (Newcombe, 1997). Su morfología no necesariamente resulta en una estructura uniforme, ya que durante el proceso de ovulación solamente del 30% al 50% de las glándulas lúteas se desarrollan uniformemente sin formar una cavidad intra-lútea, mientras que del 50% al 70% de ellas acumulan fluido dentro de la cavidad antral y forman un cuerpo hemorrágico (Bergfelt y Adams, 2007, Newcombe, 1997, Ginther, 1992). El diámetro de la glándula lútea puede ser usado para estimar su edad y funcionalidad (Ginther, 1992, Bergfelt *et al.*, 1989).

Durante los primeros días de la gestación de la yegua se presentan cada 10 a 12 días oleadas de desarrollo folicular debidas a la presencia de elevaciones periódicas de la hormona folículo estimulante (FSH). Sin embargo, los folículos dominantes que se desarrollan antes del día 30 de la gestación no llegan a ovular porque los altos niveles de progesterona impiden la secreción preovulatoria de LH. En cambio, a partir del día 35 pueden producirse ovulaciones y formación de glándulas lúteas suplementarias debido a la presencia de la gonadotropina coriónica equina (eCG), la cual actúa en los receptores de

LH de las células del folículo (Ginther, 1992). La misma eCG provoca el resurgimiento de la glándula lútea primaria entre los 35 y 45 días de gestación. Como consecuencia tanto del resurgimiento de la glándula lútea primaria como de la formación de glándulas lúteas accesorias, a partir del día 40 las concentraciones sistémicas de progesterona empiezan a aumentar significativamente (Bergfelt *et al*, 1989). Aparentemente la eCG no solamente provoca las ovulaciones accesorias, sino que también estimula tanto a la glándula lútea primaria como a las secundarias para que mantengan su secreción de progesterona hasta el día 150 -180 de la gestación. (Squires *et al*, 1974a).

La eCG es producida por las copas endometriales que se forman a partir de las células que se desprenden del cinturón coriónico del embrión y se insertan y proliferan en el endometrio. En una gestación equina resultado de la cruce de un caballo con una yegua las copas endometriales producen eCG desde el día 35-40 hasta el día 120-150 de la gestación, cuando son rechazadas inmunológicamente (Allen, 2001). Después de ese momento la actividad ovárica disminuye por falta de apoyo gonadotrópico, pero la gestación se mantiene gracias a los progestágenos secretados por la placenta (Knowles *et al.*, 1994).

Cuando una yegua es inseminada con burro con el objeto de producir un embrión mula, las copas endometriales derivadas de las células coriónicas mulares son rechazadas muy rápidamente, entre la séptima y la décimo primera semana, por lo que las concentraciones de eCG se reducen en forma muy prematura, y en ocasiones ni siquiera llegan a elevarse. Esta falta en el apoyo gonadotrópico provoca que se formen pocas glándulas lúteas suplementarias y que las concentraciones de progesterona estén muy por debajo de las encontradas durante la gestación de yegua servida con caballo (Boeta, 2008, Allen, 2001). No obstante Boeta (2008) observó que a pesar de la deficiente secreción de eCG se llegaban a presentar ovulaciones suplementarias en gestaciones híbridas. aunque el número

de glándulas lúteas acumuladas durante los primeros 120 días de la gestación fue significativamente menor (2.2) que en las yeguas servidas con caballo (2.2).

Lo anterior sugiere que, en ausencia de eCG, en las yeguas gestantes con burro la LH de origen hipofisiario podría ser responsable de la formación y mantenimiento de las glándulas lúteas suplementarias. Esto podría evaluarse mediante la administración de progestágenos exógenos, como el altrenogest, los cuales ejercen una retroalimentación negativa sobre la liberación de la LH (Lee, 2003, James *et al.*, 1998, Allen y Urwin 1980), lo que disminuirá la estimulación de esta hormona sobre la glándula lútea. Por esta razón la gestación con embrión mula resulta un modelo ideal para comprobar el posible papel de la LH en la formación de glándulas lúteas suplementarias durante la gestación equina. Sin embargo, hasta ahora no se ha evaluado la funcionalidad de la glándula lútea en gestaciones mulares antes, durante y después del tratamiento con progestágenos exógenos. Dicha evaluación se puede monitorear mediante la determinación de las concentraciones de progesterona sistémica y el uso de la ultrasonografía para la medición del diámetro de las glándulas lúteas y la detección de la formación de nuevas estructuras lúteas durante los primeros 120 días de la gestación.

## **2. HIPÓTESIS**

El tratamiento con altrenogest en yeguas gestantes con embrión mula provocará una disminución de la función lútea evitando la formación de nuevas glándulas lúteas suplementarias.

## **3. OBJETIVOS**

Evaluar los efectos de la administración de altrenogest sobre la estructura y función de las glándulas lúteas de la gestación mular a través de la medición del diámetro, conteo de número de estructuras lúteas acumuladas y su relación con la secreción de progesterona plasmática desde el día de la ovulación (día 0) hasta el día 120 de la gestación.

## **4. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **4.1 CICLO ESTRAL**

La evolución de los mamíferos es resultado de múltiples procesos de selección que han favorecido el desarrollo de gestaciones largas y el establecimiento de épocas del año durante las cuales las hembras presentan actividad ovárica y otras donde hay ausencia total de ésta, lo que ofrece ventajas contra la depredación y los cambios ambientales extremos (Geisert *et al.*, 1992). La yegua es un animal poliéstrico estacional que presenta su actividad ovárica durante los días de más horas luz (primavera-verano), de tal manera que los nacimientos de las crías ocurren el siguiente año durante los mismos meses. La duración del ciclo estral en el equino es de 21 días, con una fase folicular ó estro de 5 a 7 y una fase lútea o diestro de 15 a 16 días (Nie, 2007).

#### **4.1.1 FASE FOLICULAR**

Al intervalo entre la regresión del cuerpo lúteo y la siguiente ovulación se le llama fase folicular. La duración de ésta fase depende del grado de desarrollo que tenía el folículo ovárico dominante al momento de iniciarse la regresión del cuerpo lúteo, de la velocidad de crecimiento folicular a partir de ése momento y del tamaño requerido por el folículo para poder ovular. Dichos eventos se ven afectados por la edad, raza y principalmente por la época del año, por lo que la duración de la fase folicular tiende a ser más larga al inicio de la época reproductiva que a la mitad de la misma. El diámetro del folículo más grande influye en la luteólisis, inicio del siguiente estro, ovulación y diestro. Mientras más grande sea el tamaño folicular al inicio del estro, más rápido este folículo llegará a ovular y por lo tanto será más corto el estro (Gigli *et al.*, 2006).



La foliculogénesis se define como el proceso de formación, crecimiento y diferenciación folicular. Este proceso abarca desde el estadio de folículo primordial hasta el folículo preovulatorio.

La gran mayoría de los folículos presentes en los ovarios de la yegua son folículos primordiales que se encuentran en una fase de reposo desde la vida fetal. Para que un folículo pueda reactivar su desarrollo tiene que pasar por una etapa de activación. Activación inicial: comienza en la etapa de folículo primordial y termina con el desarrollo de un folículo terciario. Este crecimiento folicular no es dependiente de gonadotropinas; al parecer está dado por la interacción de factores inhibidores como la hormona anti-mulleriana (AMH) y factores activadores como los factores de crecimiento y diferenciación 9 (GDF-9) y la proteína morfogenética ósea 15 (BMP-15). Cuando predominan estos últimos factores, un grupo de folículos primordiales abandona el grupo de folículos inactivos y comienza el proceso de diferenciación, para llegar a la ovulación o sufrir atresia en algún momento de su diferenciación. La atresia es un proceso que se puede dar en cualquier momento de la foliculogénesis y alrededor del 99% de los folículos que comienzan la activación se atresian sin llegar a ovular (Gigli *et al.*, 2006).

Los folículos terciarios preantrales solamente pueden pasar a la siguiente fase de desarrollo cuando ocurre una segunda activación denominada activación de folículos terciarios o antrales. Durante esta etapa se necesitan grandes cantidades de gonadotropinas, especialmente de FSH. En la yegua esta activación ocurre solamente durante los meses que se incrementan las horas luz, hasta que vuelven a disminuir (Gigli *et al.*, 2006).

La ultrasonografía ha permitido describir las características del desarrollo folicular de los equinos a partir del momento en que se forma un antro de unos cuantos milímetros de diámetro. Estas observaciones han permitido describir la ocurrencia de oleadas foliculares.

Una oleada folicular es definida como el crecimiento simultáneo de un grupo de folículos antrales hasta llegar a un punto en el que divergen, continuando uno de ellos su crecimiento y diferenciación (folículo dominante) mientras que los otros sufren atresia (folículos subordinados). La dinámica folicular de los folículos antrales se divide en tres etapas: reclutamiento, selección y dominancia (Gigli *et al.*, 2006).

El reclutamiento folicular ocurre cuando un grupo de folículos antrales son estimulados por una elevación en las concentraciones de la hormona folículo estimulante (FSH). EL crecimiento de este grupo de folículos resulta en una elevación de los niveles de estradiol y de inhibina, que son hormonas secretadas por las células de la granulosa en respuesta a la FSH. Durante esta etapa varios folículos dejan de crecer y sufren atresia, por lo que solo unos cuantos alcanzan la siguiente fase (de selección). Durante la selección están presentes de 7 a 11 folículos subordinados de aproximadamente 5mm de diámetro, los cuales seguirán creciendo hasta llegar a 10-13 mm de diámetro.

Cuando el folículo más desarrollado del grupo que está creciendo alcanza un diámetro aproximado de 13mm., su secreción de estradiol e inhibina es lo suficientemente elevada para inhibir la secreción de FSH, por lo que las concentraciones de esta hormona comienzan a disminuir. En este momento se produce la selección del folículo dominante, el cual tiene gran capacidad de producción de estradiol y una mayor sensibilidad a la FSH y LH. Tanto los folículos subordinados como el dominante continúan creciendo a una velocidad de 2 a 3 mm. por día, hasta que el dominante alcanza un diámetro de 20 a 25 mm y los subordinados dejan de crecer para sufrir regresión (Bergfelt y Adams., 2007, Adams *et al.*, 1986), dicho proceso es llamado desviación. Los cambios moleculares que se llevan a cabo durante este proceso pueden ocurrir en cualquier folículo terciario, por lo que

todos los folículos pertenecientes a una oleada folicular tienen la capacidad de ser dominantes (Gastal *et al.*, 2000).

En la yegua la selección folicular se hace visible ultrasonográficamente 6 días antes de la ovulación, cuando el folículo alcanza un tamaño entre los 20 y 24 mm. Durante la dominancia el crecimiento del folículo dominante es significativamente más rápido que el de los demás folículos, facilitando así el aumento en las concentraciones intra-foliculares de estradiol, factores de crecimiento parecidos a la insulina tipo I (IGF-1), inhibina-A y activina-A, que decidirán el futuro del folículo (Ginther *et al.*, 2008, Gastal *et al.*, 2007). Conforme crece el folículo dominante, desarrolla un mayor número de receptores a LH y aumenta la secreción de inhibina y estradiol, lo que ocasionan la disminución en la secreción de FSH (Cox *et al.*, 2009, Nambo *et al.*, 2002, Bergfelt *et al.*, 2001).

Los folículos de las yeguas al igual que los de otras especies tienen la capacidad de producir un factor de crecimiento parecido a la insulina y se ha encontrado que la proteína ligada al factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 2 (IGFBP-2) presenta niveles más bajos en folículos preovulatorios ó cerca de la ovulación (Watson *et al.*, 2005). Dichos datos sugieren que estos factores pueden actuar como moduladores para mejorar la sensibilidad a FSH y LH (Ginther *et al.*, 2006).

Conforme un folículo dominante continúa creciendo, llega un momento en que las concentraciones crecientes de estradiol aumentan la secreción pulsátil de GnRH, lo que provoca un aumento en el número de receptores de GnRH en la hipófisis. Las mayores concentraciones de GnRH actúan en una hipófisis con alta concentración de receptores que estimula la oleada de LH, lo que conduce a la ovulación (Ginther *et al.*, 2006, Knobil y Neill, 1998). Las altas concentraciones de estradiol también son responsables de la receptividad sexual, relajación del cérvix, el aumento en el diámetro del canal cervical,

aumento en la secreción del fluido oviductual y aumento en la producción de los fluidos lubricantes del cérvix y la vagina. Todo lo anterior es requerido para crear un ambiente adecuado durante la ovulación y facilitar la fertilización ((Knobil y Neill, 1998, Ginther, 1992).

#### 4.1.2 OVULACIÓN

La ovulación ocurre durante la fase folicular y es el resultado de una cascada de eventos iniciados por la oleada de LH, que es necesaria para el crecimiento folicular final, la ovulación y la formación de la glándula lútea (Guyton y Hall, 1997). La oleada preovulatoria de LH induce en las células de la granulosa un aumento en el RNA mensajero del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), así como otros factores de crecimiento (amphiregulin-epiregulin) (Cox *et al.*, 2009). Otros elementos que tienen efectos sobre las células foliculares y lúteas son los factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGF's), que aumentan la capacidad de los receptores a LH (LH-R) (Watson *et al.*, 2005). La LH inicia su secreción desde que comienza el estro, aumentando conforme avanza la receptividad sexual, para posteriormente disminuir gradualmente después de que ocurre la ovulación. Alexander e Irvine (1996) observaron que la yeguas administración de naloxona durante el estro inducía pequeños aumentos de GnRH, FSH y LH alrededor de la ovulación, sugiriendo la posibilidad de que en las yeguas los opiodes modulan continuamente el almacenamiento de la LH asegurando su liberación gradual, hasta que los pulsos de GnRH son más rápidos y provocan la elevación preovulatoria de LH (Alexander e Irvine., 1996).

En el folículo preovulatorio la LH estimula la producción de histamina y prostaglandina E2 (PGE2), que favorecen la producción de factores angio-génicos. El incremento en el flujo sanguíneo, que tiene como propósito asegurar que dicho folículo preovulatorio sea abastecido hormonalmente para su maduración final. Además se estimula la síntesis de la colagenasa; enzima que colabora en la disolución de la pared del folículo. Al mismo

tiempo la prostaglandina F2 alfa ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) ayuda a la evacuación del líquido folicular por contracción. Inmediatamente después de la ovulación las paredes del folículo colapsan, dando origen a varios pliegues que permite que las células de la granulosa y la teca se mezclen, formando una estructura glandular (Senger, 2003).

#### 4.1.3 FASE LÚTEA

La fase lútea o diestro es el periodo durante el cual la hembra no tiene receptividad sexual y su aparato genital se prepara para mantener una gestación. Esta fase tiene una duración de 15 a 16 días, periodo en el que ocurre la formación y desarrollo del cuerpo lúteo, que continúa funcionando hasta que se lleva a cabo su regresión (luteólisis) (Senger 2003)

El cuerpo lúteo es considerado una glándula temporal que juega un papel primordial en la regulación del ciclo estral y cuya función principal es secretar progesterona para mantener la gestación en los mamíferos (Gigli *et al.*, 2006).

Durante la fase lútea las concentraciones de LH se mantienen basales (10-15 ng/ml) entre el día 5 y el día 16 del ciclo (ovulación = día 0) debido a que la progesterona producida por el cuerpo lúteo produce retroalimentación negativa. A pesar de ello, las pequeñas cantidades de LH presentes durante la fase lútea son suficientes para que se manifieste el efecto luteotrópico de la hormona y se mantenga la función lútea. (Greaves *et al.*, 2001)

Después de la luteólisis, al reducirse las concentraciones de progesterona desaparece la retroalimentación negativa, por lo que se acelera la frecuencia de secreción de GnRH y se incrementan gradualmente los niveles de LH, alcanzando un pico en su secreción 24 horas antes de la ovulación, para provocar la maduración final del folículo preovulatorio (Ginther *et al.*, 2006).

##### 4.1.3.1 Luteinización y formación de la glándula lútea

Al momento de la ovulación, el folículo disminuye su tamaño debido a la pérdida del fluido folicular, llevando a cabo en pocas horas cambios estructurales y genómicos que transforman a las células de la granulosa en células lúteas (Stocco *et al.*, 2007, Newcombe, 1997, Townson y Ginther 1989).

Muchos genes transitorios son rápidamente estimulados por el incremento de LH. El fenotipo final de las células lúteas depende de la combinación específica de genes que codifican para proteínas reguladoras así como de factores de transcripción y proteínas señaladoras, que aseguran su expresión para la adecuada función celular lútea (Stocco *et al.*, 2007).

La luteinización también está regida por los cambios en la expresión de proteínas necesarias para la síntesis de progesterona, principalmente la proteína esteroideogénica de regulación aguda (StAR), el citocromo P450 y enzimas (CYP11A1) (Brown *et al.*, 2007).

La formación de la glándula lútea no necesariamente resulta en una morfología uniforme. Algunas glándulas lúteas se desarrollan homogéneamente sin la formación de una cavidad intra-lútea, pero la mayoría forma un cuerpo hemorrágico, que es una cavidad llena de sangre y trasudado, que gradualmente disminuye de tamaño debido a la organización de tejido conectivo asociado al proceso de coagulación (Townson y Ginther., 1988, 1989). La formación del cuerpo hemorrágico parece ser un evento azaroso, por lo que la morfología de las glándulas lúteas que se forman en un determinado ovario en ovulaciones sucesivas es muy variable. La presencia de una cavidad intralútea no afecta la función de la glándula lútea ni la duración de la fase lútea (Ginther, 1992, Bergfelt y Adams., 2007, Townson *et al.*, 1989).

#### **4.1.3.2 Conformación de la glándula lútea**

Desde el punto de vista estructural, la glándula lútea está formada por células esteroideogénicas, como las de la granulosa y las de la teca, y células no esteroideogénicas como fibroblastos, células endoteliales y células inmunes. Después de la ovulación, el cuerpo lúteo se forma partir de células residuales de la granulosa, las cuales se diferencian en células lúteas grandes, que se convierten en las principales productoras de esteroides. Las células de la teca interna desempeñan un pobre papel en la producción de progesterona y estradiol. No obstante estas células son las encargadas de sintetizar la mayor parte de andrógenos que serán aromatizados por las células de la granulosa (Stocco *et al.*, 2007, Gigli *et al.*, 2006, Webb *et al.*, 2002).

#### **4.1.3.3 Regulación de la función lútea**

La permanencia y función de la glándula lútea están reguladas por mediadores estimulantes (luteotrópicos) y mediadores inhibitorios (luteolíticos) (Aguilar *et al.*, 2006). Las hormonas luteotrópicas son las responsables del crecimiento y la funcionalidad del tejido lúteo. En diversas especies actúan como hormonas luteotrópicas la LH, la GH (hormona del crecimiento), la prolactina, la oxitocina, la PGE2 (prostaglandina E2) y el IGF-I (factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1) (Watson *et al.*, 2005, Niswender *et al.*, 2000).

Adicionalmente, en algunas especies se producen durante la gestación hormonas luteotrópicas de origen placentario. En la yegua, durante la gestación temprana la eCG estimula la función lútea durante todo el periodo funcional de las copas endometriales (día 40 al 150 de la gestación) (Daels *et al.*, 1998, Squieres *et al.*, 1974a, Squieres *et al.*, 1974b). En el caso de la yegua vacía en el día 13 del ciclo estral (0=ovulación) al estar ausente el embrión se da la liberación de prostaglandina F2- $\alpha$  producida por el endometrio (Aguilar

*et al.*, 2006). La PGF<sub>2</sub> quien induce la regresión lútea (Vanderwall *et al.*, 1994, Watson, 1991) y suprime la secreción de progesterona (Aguilar *et al.*, 2006).

#### **4.1.3.4 Síntesis de progesterona por las células lúteas**

La LH hipofisiaria estimula a las células lúteas para producir progesterona (Sirios *et al.*, 1991). La progesterona se produce a partir de colesterol que en su mayor parte llega a la célula lútea unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales son internalizadas después de unirse a sus receptores en la membrana de la célula lútea. Cuando la LH se une a receptores específicos también localizados en la membrana plasmática, activa a la proteína G, que a su vez activa a la adenilato ciclasa que promueve la conversión del ATP a AMP cíclico para activar a la enzima llamada proteína Kinasa (Senger, 2003). Esta última enzima fosforila proteínas específicas dentro de la célula, lo que provoca una cascada de efectos que resultan en el paso de colesterol al interior de la membrana mitocondrial interna, donde reside el complejo enzimático que transforma el colesterol en pregnenolona, la molécula precursora de todas las hormonas esteroideas. (Senger, 2003)

Para que el colesterol pueda entrar a la mitocondria, la cadena de eventos es iniciada por la unión de la LH a su receptor que provoca la activación de proteínas como la SCP (sterol carrier protein) y la StAR, siendo esta última la responsable de la traslocación del colesterol al interior de la membrana de la mitocondria. Ya dentro de la mitocondria el complejo enzimático P-450<sub>sc</sub> corta la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona. (Watson *et al.*, 2000). La posterior transformación de pregnenolona a progesterona es mediada por la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ<sup>5</sup>,Δ<sup>4</sup> isomerasa (3β-HSD) presente en el retículo endoplásmico de la célula lútea (Díaz Chico, 2004).

#### **4.1.3.5 Funciones de la progesterona**



La progesterona es la hormona de mayor importancia en el control endocrino de la reproducción, ya que es la encargada de realizar la retroalimentación negativa sobre la LH hipofisaria (Ginther *et al.*, 2006). La época del año también influye sobre los niveles sistémicos de progesterona, ya que se produce una disminución en las concentraciones de LH durante el diestro de yeguas que se encuentran próximas a la época anovulatoria (Nagy *et al.*, 2004).

Durante la fase folicular las concentraciones de progesterona permanecen basales y se comienzan a incrementar entre los días 1-5 postovulación. En caso de ocurrir ovulaciones dobles habrá mayores concentraciones de progesterona, que se mantienen hasta la luteólisis funcional (Ginther *et al.*, 2008, Niswender *et al.*, 2000).

En la mayoría de los mamíferos la progesterona es esencial para el mantenimiento de la gestación. Dependiendo de la especie puede ser producida por el ovario y/o la placenta (Ousey *et al.*, 2005).

La progesterona es la principal hormona ovárica necesaria para la viabilidad del embrión y la función de algunas proteínas uterinas específicas, además que participa en el reconocimiento de la gestación. Los órganos blanco de acción de esta hormona son el aparato reproductivo, glándula mamaria y el eje hipotálamo-pituitario-gonadal. El útero presenta dos ejidos blanco: el glandular del endometrio y el muscular del miometrio (Mckinnon *et al.*, 1988, Kastelic *et al.*, 1987).

La progesterona parece ejercer la mayoría de sus efectos a través de la regulación directa de la transcripción de genes por medio de receptores nucleares específicos que actúan como factores de transcripción inducibles por su ligando. La unión de la progesterona con dichos receptores resulta en la translocación del complejo hormona-receptor al núcleo celular y su unión a elementos específicos de respuesta que resultan en la activación de la transcripción

del DNA de genes específicos. Para la producción de receptores de progesterona, se requiere una exposición previa a los estrógenos en el aparato reproductor (Niswender *et al.*, 2000).

En las yeguas la progesterona es producida por el tejido lúteo durante los primeros 150 días de la gestación. Adicionalmente, a partir del día 80 de la gestación la unidad fetoplacentaria sintetiza  $5\alpha$ -pregnanos (P5) hasta el término de la gestación (320-345 días) (Ousey *et al.*, 2005).

#### **4.1.3.6 Vascularidad de la glándula lútea**

El desarrollo de capilares a partir de los vasos sanguíneos existentes resulta esencial para el desarrollo y función del cuerpo lúteo (Stocco *et al.*, 2007). Existe una estrecha relación entre el aporte sanguíneo a la glándula lútea y las concentraciones de progesterona circulante (Ginther *et al.*, 2007, Bollwein *et al.*, 2002). El aporte sanguíneo existente en la glándula lútea es de 30 ml/min/gr de tejido, que es mucho mayor con respecto a otros órganos (Wiltbank., 1994).

Poco después de la elevación preovulatoria de la LH, las primeras células vasculares en invadir el parénquima lúteo son los pericitos, células de tejido conectivo que provienen de las células de la teca y que dan soporte a los capilares (Stocco *et al.*, 2007). La LH induce la expresión de los factores de crecimiento endotelial (VEGF) y sus receptores en folículos preovulatorios. Dichos factores vasculares tienen un efecto mitogénico en las células endoteliales del cuerpo lúteo, especialmente durante los primeros instantes de su formación (Charnock-Jones y Smith., 1998). Las células endoteliales forman cerca del 50% del tejido lúteo (Wiltbank., 1994) y cada célula lútea está en contacto directo con muchos capilares (Stocco *et al.*, 2007). La gran vascularidad de esta glándula además de llevar progesterona

a la circulación sistémica sirve también para llevar nutrientes, hormonas y permear proteínas, colaborando así con el aporte de sustratos para la biosíntesis de progesterona y para la secreción de otras hormonas esteroides (Stocco *et al.*, 2007, Bollwein *et al.*, 2002, Wiltbank., 1994). La glándula lútea presenta su mayor aporte sanguíneo alrededor del día 10 postovulación, y al final de la fase lútea se da una disminución en el volumen de los capilares lúteos lo que coincide con la disminución del aporte sanguíneo a la glándula lútea, marcando la luteólisis estructural (Ginther *et al.*, 2007).

#### **4.1.3.7 Luteólisis**

En caso de que no ocurra una gestación la glándula lútea sufre un proceso llamado luteólisis para dar inicio a un nuevo ciclo estral (Stocco *et al.*, 2007). El término de la fase lútea da inicio con la liberación de la prostaglandina F<sub>2</sub>α. Este factor luteolítico es liberado por el endometrio entre los días 13 y 16 post ovulación (Alamo *et al.*, 2008, Aguilar *et al.*, 2006, Sharp *et al.*, 1984). Como consecuencia de la de la lisis del cuerpo lúteo las concentraciones de progesterona caen a menos de 2ng/ml en las siguientes cuatro horas (Carluccio *et al.*, 2008), considerándose esto como una luteólisis funcional que precede a la regresión estructural de la glándula lútea, la cual es acompañada por cambios en el aporte sanguíneo, infiltración de leucocitos y muerte de las células esteroideogénicas y endoteliales por mecanismos apoptóticos y no-apoptóticos (Aguilar *et al.*, 2006). El cuerpo lúteo de las yeguas muestra una mayor afinidad por la PGF<sub>2</sub> que el de otras especies, (Carluccio *et al.*, 2008, Utt *et al.*, 2007)

La oxitocina también contribuye a la luteólisis por que al actuar en sus receptores uterinos provoca la secreción de PGF<sub>2</sub>α (Utt *et al.*, 2007, Handler *et al.*, 2004). Durante la luteolisis

se presentan varios pulsos de  $\text{PGF2}\alpha$  para lograr la supresión permanente de la función lútea (Handler *et al.*, 2004).

#### **4.2 EVALUACIÓN ULTRASONOGRÁFICA DE LA GLÁNDULA LÚTEA**

El estudio del aparato reproductor de la yegua por medio del ultrasonido ha sido utilizado para visualizar, estudiar y lograr una mejor comprensión de los eventos fisiológicos y patológicos implicados con la reproducción equina. En el caso de la glándula lútea la ultrasonografía ha permitido estudiar su formación y lisis tanto en el ciclo estral como en la gestación. A la ultrasonografía se evalúan características como la ecogenicidad, diámetro y con el ultrasonido doppler a color es posible observar el flujo sanguíneo (Ginther *et al.*, 2007, Bergfelt y Adams, 2007, Bergfelt *et al.*, 2006, Sevinga *et al.*, 1999, Bergfelt *et al.*, 1989, Townson y Ginther 1989). La ecogenicidad es determinada por la asignación de una escala de grises, siendo que los valores bajos están representados por imágenes oscuras (anecoicas) y poco tejido ecogénico; mientras que los valores altos están representados por imágenes blancas (ecogénicas) y más tejido ecogénico. La mayor vascularidad y producción de progesterona coincide con una apariencia justo a la mitad de la escala de grises (Bergfelt y Adams 2007, Pierson y Ginther 1985). La determinación del diámetro de la glándula debe calcularse como el promedio de dos mediciones perpendiculares, este diámetro promedio también tiene una relación directa con la cantidad de progesterona secretada (Bergfelt y Adams 2007, Bergfelt *et al.*, 1989). Para medir la vascularidad es necesario un ultrasonido doppler a color, que muestra en colores el flujo sanguíneo, el cual también está directamente relacionado con la producción de progesterona (Ginther *et al.*, 2007). Por todo lo anterior las características ultrasonográficas de la glándula lútea pueden

ser de utilidad para evaluar su edad y funcionalidad durante el ciclo estral y durante la gestación (Ginther *et al.*, 2007, Bergfelt y Adams 2007, Bergfelt *et al.*, 1989).

#### 4.3 TERMINOLOGIA DE LA GLÁNDULA LÚTEA

El cuerpo lúteo primario es aquel que se origina como resultado de una ovulación durante la fase folicular del ciclo estral. El cuerpo lúteo secundario se origina de ovulaciones ocurridas durante la fase lútea (ovulaciones de diestro), o más comúnmente durante la gestación temprana. Mientras que los cuerpos lúteos accesorios se originan de folículos anovulatorios que se luteinizan durante la gestación temprana. Tanto a los cuerpos lúteos secundarios como a los accesorios se les denomina también cuerpos lúteos suplementarios. Los cuerpos hemorrágicos son estructuras transitorias que se forman posteriormente a una ovulación para formar los cuerpos lúteos primarios o secundarios. Al final de su vida funcional, después de que el cuerpo lúteo sufre regresión quedara una pequeña cicatriz llamada cuerpo albicans. (Ginther 1992).

A continuación se muestra un cuadro con la terminología de la glándula lútea.

TERMINOLOGIA DEL CUERPO LÚTEO DURANTE EL CICLO ESTRAL Y GESTACIÓN TEMPRANA	
ESTRUCTURA LÚTEA	DEFINICIÓN
Cuerpo lúteo primario	Resultado de ovulaciones simples o múltiples, dentro de la fase folicular.
Cuerpo lúteo secundario	Resultado de ovulaciones dentro de la fase lútea (ovulaciones de diestro) ó gestación temprana
Cuerpos lúteos accesorios	Resultado de la luteinización de folículos anovulatorios, durante la gestación temprana
Cuerpo lúteo suplementario	Incluye secundarios y accesorios durante la gestación temprana
Cuerpo hemorrágico	Acumulo de líquido y tejido de remodelación en la luteinización

Cuerpo albicans	Remanente del cuerpo lúteo
-----------------	----------------------------

Figura 1. Adaptada de Ghinther, 1992.

#### 4.4 FISIOLÓGÍA DE LA GESTACIÓN TEMPRANA

Entre el día 6 y 7 postovulación el embrión equino atraviesa el oviducto y llega al útero a través de la papila utero-tubal. Durante el transporte por el oviducto, el embrión que se encuentra en estado de mórula secreta PGE<sub>2</sub>, para relajar las fibras del músculo liso del oviducto, lo que permite su paso hacia el cuerno uterino (Allen, 2001). En cambio, si el óvulo no es fertilizado, al no producir PGE<sub>2</sub> no puede ser transportado hasta el útero y queda retenido en el oviducto. El embrión llega al útero en etapa de blastocito y poco después comienza una expansión relativamente rápida que resulta en el adelgazamiento y pérdida de la zona pelúcida. Sin embargo, el embrión equino no queda desnudo al salir de la zona pelúcida, ya que durante la formación del blastocito se deposita entre el trofoblasto y la zona pelúcida una cápsula rica en glicocalix que permanece rodeando al embrión hasta el día 25 o 26 de la gestación. Durante este periodo la capsula evita su elongación y le confiere elasticidad y resistencia contra las contracciones uterinas ejercidas sobre él (Allen, 2001).

##### 4.4.1 RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA GESTACIÓN

El reconocimiento materno de la gestación permite a la hembra gestante alargar la vida de la glándula lútea y asegurar su función secretora más allá de su periodo de vida en un ciclo sin gestación. Esto permite mantener un estado progestacional correcto para el mantenimiento de la gestación.

Alrededor del día 13 postovulación la secreción pulsátil de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  no ocurre en aquellas yeguas que presentan un embrión viable (Allen, 2001, Ginther, 1992), el cual promueve la

expresión de factores indirectos como la PGE2 y la enzima PGSH2 que colaboraran en la continuidad de la función lútea (Ealy *et al.*, 2009, Watson y Sertich, 1990). El reconocimiento de gestación comienza en el día 8 post-ovulación, cuando el embrión se mueve completamente libre en el lumen uterino, impulsado por contracciones peristálticas del miometrio, las cuales son promovidas por la PGE2 secretada por el embrión. De esta forma, el embrión recorre muchas veces cada parte del lumen uterino, moviéndose desde un cuerno hasta el otro de 10 a 20 veces por día (Ginther, 1998, Griffin y Ginther 1990). En el día 16 de la gestación el embrión deja de moverse, debido a que aumenta el tono miometrial. Lo que inmoviliza y fija la vesícula embrionaria a la base de uno de los cuernos (Ealy *et al.*, 2009, Allen, 2001, Ginther, 1998). EL embrión produce tanto PGE2 como PGF2 $\alpha$  durante el reconocimiento materno de la gestación. Estos factores parecen tener un papel indirecto en el mantenimiento de la función del cuerpo lúteo, a través de las contracciones uterinas que promueven la migración del embrión para lograr que el factor antiluteolítico secretado por el embrión se ponga en contacto con las células endometriales, en las que promueve una alteración en la expresión de la enzima sintetasa de prostaglandinas tipo 2 (PGHS2) (Ealy *et al.*, 2009).

#### 4.4.2 FUNCIÓN LÚTEA DURANTE LA GESTACIÓN TEMPRANA

En la mayoría de los mamíferos la luteólisis es bloqueada cuando está presente un embrión viable (Ginther, 1998; Ealy *et al.*, 2009). Como se mencionó anteriormente, la oxitocina juega un papel importante en la luteólisis, pero en la yegua gestante en el día 14 de la gestación existe una mucho menor concentración de receptores para oxitocina que los que

se desarrollan en un ciclo estral normal, lo cual es debido a la señal anti-luteolítica producida por el embrión (Ealy *et al.*, 2009).

#### 4.4.3 ENDOCRINOLOGIA DE LA GESTACION

La gestación temprana se caracteriza por tener bajas concentraciones de LH debido a la retroalimentación negativa ejercida por la progesterona. Sin embargo, la secreción de FSH continúa de manera bifásica, lo que promueve el desarrollo de folículos dominantes que no llegan a ovular (Miller *et al.*, 1980, Gigli *et al.*, 2006).

Debido a la gran afinidad de la LH por sus receptores lúteos, permite que la glándula lútea primaria se mantenga viable pese a las bajas concentraciones de LH circulante durante el diestro y la gestación temprana (Holtan *et al.*, 1975). Durante los primeros 35 días de la gestación la función lútea es mantenida principalmente por la LH materna, lo que continúa siendo cierto hasta la resurgencia de la glándula lútea primaria que es interpretada como la segunda respuesta lútea a la gestación (Ginther, 1992).

#### 4.4.4 RESURGENCIA DE LA GLÁNDULA LÚTEA PRIMARIA

En yeguas gestantes las concentraciones de progesterona circulantes disminuyen gradualmente entre el día 12 y 30 post-ovulación, recuperándose significativamente a partir del día 35 debido a la estimulación ejercida por la gonadotropina coriónica equina (eCG), la cual es producida en altas concentraciones por las copas endometriales en gestaciones equinas desde el día 35 hasta el día 120-150 de la gestación, cuando las copas endometriales son rechazadas inmunológicamente por la madre. Durante todo este periodo la eCG tiene la capacidad de estimular a la glándula lútea primaria, lo que se refleja en un



de progesterona y de su diámetro (Ginther, 1992, Bergfelt *et al.*,1989, Squires *et al.*, 1974b).

#### 4.4.5 GLÁNDULAS LÚTEAS SUPLEMENTARIAS

A partir del día 40 de la gestación la secreción de eCG estimula la formación de glándulas lúteas secundarias que se convierten en fuentes adicionales de progesterona (Bergfelt *et al.*, 1989) que persisten hasta los 150 días de la gestación, cuando la placenta ya está lo suficientemente desarrollada para encargarse de mantener la gestación exitosamente (Ginther, 1992, Martin *et al.*, 1989 , Bergfelt *et al.*, 1989, Squires *et al.*,1983). Se ha comprobado que las glándulas lúteas secundarias no se presentan en todas las gestaciones y su desarrollo en el tiempo es extremadamente variable, lo que sugiere que no son indispensables para mantener la gestación (Ginther, 1992). Para lo que se han encontrado gestaciones que se mantienen solamente con la glándula lútea primaria, especialmente si fueron yeguas servidas al final de la época ovulatoria, cuando el pobre desarrollo folicular no permite la formación de estructuras lúteas. (Bergfelt y Adams, 2007).

#### 4.4.6 COPAS ENDOMETRIALES

El trofoblasto equino está dividido en dos componentes: uno de carácter invasivo, y otro no invasivo. Entre el día 25 y 35 post-ovulación se desarrolla un discreto engrosamiento de células del trofoblasto que forman un anillo en la región ecuatorial de la superficie exterior del corion, rodeándolo a la altura del sitio de contacto entre el saco vitelino en regresión y el alantoides en crecimiento. Esta estructura, llamada cinturón coriónico (Allen y Moor, 1972), contiene pliegues que aumentan en número y se proyectan hacia el interior de las vellosidades uterinas. Este espacio se llena de material extracelular que sirve de adherencia entre las superficies coriónica y uterina (Allen *et al.*, 1973)

A partir del día 36-38 las células del cinturón coriónico se desprenden y adquieren propiedades invasivas para incrustarse en el endometrio, destruyendo a las células epiteliales glandulares y eliminando su membrana basal para invadir el estroma endometrial y así dar lugar a la formación de las copas endometriales responsables de la secreción de eCG (Thway *et al.*, 2001). En el día 40 ya están establecidas en el endometrio. A partir de este momento se detiene la invasión de nuevas células, pero las que ya están establecidas continúan proliferando hasta formar protuberancias macroscópicas llamadas copas endometriales (Murphy y Martinuk., 1991). Histológicamente cada copa está formada por un paquete compacto de células epiteliales grandes y binucleadas, entremezcladas ocasionalmente con vasos sanguíneos y situadas en la porción basal de las glándulas endometriales, mientras que las porciones apicales son obliteradas durante la invasión del cinturón coriónico (Allen, 2001). Inicialmente las copas endometriales son circulares y de tamaño pequeño (1-2 mm de diámetro), pero crecen continuamente hasta alcanzar su máximo tamaño y su máxima capacidad secretora entre los días 60-70 de la gestación (Allen, 2001).

El desarrollo de las copas endometriales y la cantidad de eCG que secretan depende en entre otras cosas de la configuración del endometrio al momento de ser invadido (Allen, 2000), del genotipo del embrión y de la compatibilidad inmunológica entre los tejidos del embrión y los de la madre (Knobil y Neil, 1998).

La introducción de células especializadas del trofoblasto en el endometrio materno tiene implicaciones tanto endocrinológicas como inmunológicas para el mantenimiento de la gestación. Las células endometriales de las copas secretan una hormona glicoprotéica de alto peso molecular, llamada gonadotropina coriónica equina (eCG) (Allen, 2001). La eCG se une a los receptores para LH en el ovario, pero con una afinidad diez veces menor. Esta

diferencia se debe a diferencias en la composición de carbohidratos entre la LH y la eCG (Stewart y Allen, 1981). A partir del día 40 de la gestación equina las concentraciones de eCG en el suero materno aumentan rápidamente de 20 hasta 300 UI/ml, después declinan con la degeneración de las copas endometriales entre los días 120 y 150 de la gestación. Las células del cinturón coriónico de origen fetal y su secreción de eCG son necesarias para el incremento de las concentraciones de progesterona (Allen y Moor, 1972). Durante este periodo la eCG provoca la ovulación y/o luteinización de los folículos provenientes de las oleadas foliculares en el ovario. Además de estimular la producción de progesterona, la eCG provoca un incremento en la secreción de andrógenos, y estrógenos conjugados secretados por la glándula lútea (Allen, 2001, Daels *et al.*, 1996), con lo que asume un papel primordial en la regulación de la esteroidogénesis lútea. Ocurre un segundo incremento en la secreción de dichas hormonas entre los días 70 y 80, atribuyéndolo a la unidad feto-placentario (Allen, 2001).

Las células invasivas del cinturón coriónico expresan altas concentraciones del Antígeno de Histocompatibilidad Clase 1 (MHC-1) de origen paterno, el cual es capaz de estimular una gran respuesta humoral y celular por parte del sistema inmune de la madre, de tal manera que entre el día 50 y 54 de la gestación comienzan a aparecer anticuerpos linfocitotóxicos en contra de las copas endometriales. Dichos anticuerpos persisten en gestaciones posteriores en las yeguas servidas con el mismo semental (Allen, 2001).

Para el día 120-150 en la mayoría de las yeguas las copas endometriales están completamente necróticas y separadas de la superficie del endometrio (Allen, 2001). Mientras para el caso de las yeguas servidas con burro, el cinturón coriónico que se desarrolla es más estrecho y menos desarrollado. Aparentemente esta diferencia es causada por la impronta genómica de los genes que controlan el desarrollo del cinturón coriónico.

Se ha observado que existe un papel dominante del medio del útero en el desarrollo de las copas endometriales (Allen 2000, Enders *et al.*, 1996). Allen *et al.*, (2001) han observado que en yeguas a las que se les ha transferido un embrión burro el cinturón coriónico no se desarrolla de manera adecuada, por lo que la invasión de las células coriónicas al endometrio materno no se lleva a cabo. En otro trabajo el mismo autor realizó la bipartición de un embrión mular, transfiriendo un hemi-embrión a una yegua y otro a una burra, obteniendo resultados contrastantes. En el caso de la gestación de la yegua se desarrolló un cinturón delgado que originaba copas endometriales pequeñas con poca secreción de eCG, mientras que en la gestación de la burra se desarrollo un cinturón coriónico ancho, con copas endometriales anchas y grandes que secretaban altas concentraciones de eCG. En las gestaciones híbridas de burro con yegua los leucocitos de la madre comienzan a atacar a las células endometriales desde el día 50 de la gestación, por lo que para el día 60 ó 70 han sido completamente destruidas, debido a los antígenos de histocompatibilidad que posee el embrión mula (Allen, 1984).

Debajo de cada copa endometrial se forman cavidades linfáticas en las que comienzan a concentrarse linfocitos CD4 y CD8, junto con células plasmáticas, macrófagos y eosinófilos que se depositan en la periferia del estroma de la copa. Entre los 70 y 80 días las copas endometriales empiezan a degenerarse debido a la muerte de sus propias células y también por la infiltración de leucocitos que empiezan a invadir las copas endometriales hasta destruirlas. Las copas endometriales se hacen pálidas y con apariencia caseosa, debido al reestablecimiento paulatino de las glándulas endometriales, el acumulo de material exocrino secretorio es liberado y mezclado con los restos de las células necróticas, en un coagulo rico en actividad de eCG (Allen, 2001).

#### **4.5 GESTACIÓN MULAR**

Las diversas especies de équidos poseen la capacidad de reproducirse unas con otra, dando como resultado generalmente una progenie híbrida infértil. En la mula es clara la expresión de los dos fenotipos parentales, en tanto que los genotipos fetales tienen una marcada influencia en el desarrollo de la placenta, especialmente en el desarrollo del cinturón coriónico (Allen y Short, 1997).

Las mulas se han usado en trabajos donde se necesita alta capacidad de resistencia, por lo que basado en estas características, las mulas se parecen mucho más a los burros que a las yeguas. En cambio el híbrido burdegano, que se obtiene de la cruce de una burra con un garañón es más parecido al caballo. Las observaciones hechas desde hace mucho tiempo indican diferencias en la expresión de los genomas paternos y maternos en los mamíferos (Konyukhov y Platonov, 2001).

En yeguas que llevan gestaciones mulares, la reacción inmunitaria en contra de las copas endometriales se caracteriza desde el principio por una infiltración masiva de linfocitos alrededor de las copas endometriales, lo que interfiere con la formación normal de las mismas y resulta en un rechazo inmunológico prematuro, por lo que las concentraciones de eCG se reducen en forma muy prematura y en ocasiones ni siquiera llegan a elevarse, por lo que este tipo de gestación se mantiene sin la necesidad de eCG (Boeta y Zarco, 2005). No obstante, Boeta (2008), observaron ovulaciones suplementarias con este mismo modelo experimental, aunque es un hecho que en yeguas servidas con caballo el promedio de cuerpos lúteos que se acumulan a lo largo de la gestación es significativamente mayor (2.9 CL) que el de yeguas servidas con burro ( 2.2 CL). (Boeta, 2008)

#### 4.6 PROGESTÁGENOS EXÓGENOS

El suplemento con progestágenos en las yeguas se ha vuelto una práctica común en la industria equina. El altrenogest es el progestágeno más utilizado. Se administra a una dosis de 0.044mg/kg de peso por vía oral (Hodgson *et al.*, 2005). Este producto hormonal es utilizado ampliamente en el manejo reproductivo del equino para acortar la época de transición primaveral, para suprimir la conducta estral, para sincronizar estros, retrasar la ovulación, transferir embriones y para mantener gestaciones con riesgo de aborto (Vanderwall y Newcombe, 2007, Squieres, 1993, Shoemaker *et al.*, 1989, Wiepz *et al.*, 1988, Hinrichs *et al.*, 1986, Luliano and Squires, 1986, Squires *et al.*, 1979). Se han reportado tratamientos con altrenogest a diferentes dosis (0.044 mg/kg, 0.088 mg/kg) para provocar una disminución en la secreción de la oleada de LH, alterando su pico ovulatorio (Denniston *et al.*, 2006, Lee, 2003, James *et al.*, 1998, Jasko *et al.*, 1993).

En el caso de yeguas en transición, durante la aplicación del tratamiento se ha observado que el crecimiento folicular es inhibido y la hormona luteinizante (LH) contenida en la pituitaria aumenta, obteniéndose un rebote en la secreción de dicha gonadotropina al suspender el tratamiento (McCue *et al.*, 2001, Squires, 1993, Squires *et al.*, 1983, Squires *et al.*, 1979).

Para determinar el efecto del altrenogest en el mantenimiento de las gestaciones tempranas, Voller *et al.*, (1991) suprimieron la función lútea por medio de una prostaglandina natural y administraron altrenogest diariamente desde el día 4 post ovulación hasta el día 85 de la gestación, observando que todas las yeguas tratadas mantenían la gestación a pesar de la ausencia de la glándula lútea primaria. También observaron que las ovulaciones secundarias y/o suplementarias ocurrían entre los 32 y 85 días de la gestación, con un subsecuente aumento en las concentraciones plasmáticas de

progesterona (Voller *et al.*; 1991), las cuales no eran afectadas por la secreción de eCG (Jackson *et al.*, 1986). En otros estudios en los que se utilizó altrenogest durante toda la gestación se observó que no altera la longitud de esta, así como tampoco el desarrollo del embrión, el peso de la placenta ó la incidencia de retención placentaria, provocando solo una ligera masculinización del clítoris para el caso de las potrancas (Ball *et al.*, 1992, Shoemaker *et.al.*, 1989).

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 Localización**

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

### **5.2 Animales y grupo experimental**

Se evaluaron 24 yeguas clínicamente sanas, con un rango de edad entre los 5 y 10 años, un peso promedio de 280 kg y una condición corporal entre 2.5 y 3.5 en una escala de 0 a 5 (Martin-Rosset, 1993). Los animales se mantuvieron con alimentación a base de heno de avena, heno de alfalfa y concentrado.

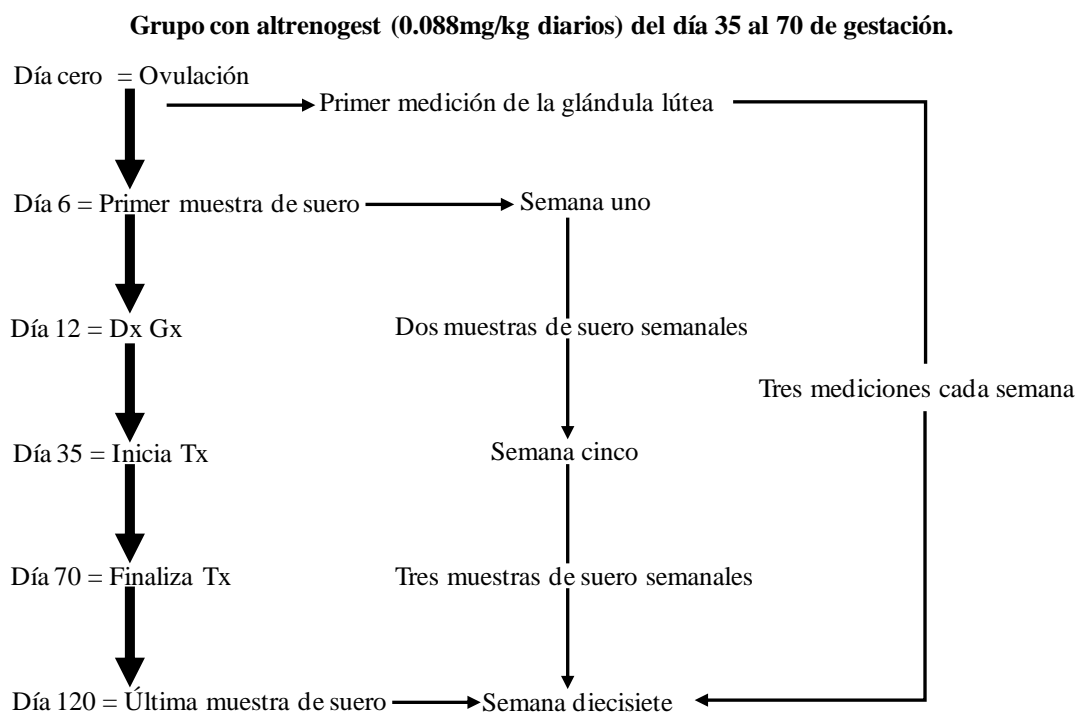
A cada yegua se le realizó un examen físico general para descartar cualquier enfermedad, así como un examen ginecológico completo para confirmar su salud reproductiva. Diariamente se detectaron estros por medio de un macho recelador. Las yeguas que mostraban interés al semental se examinaban a través de palpación rectal y ultrasonografía para determinar el grado de desarrollo folicular y programar el servicio lo más cercano a la ovulación. Se recolectó semen de burro de la raza Kentucky por medio de una vagina artificial modelo Missouri, y posteriormente se inseminaba en fresco (Boeta y Zarco, 2000). A partir del servicio se realizó tres veces por semana la medición de la glándula lútea, determinando su diámetro mediante la obtención de un promedio de dos mediciones, la primera hecha en el diámetro mayor de la glándula, y la segunda realizada en forma perpendicular a la primera. A partir de los 12 días post-ovulación se realizó el diagnóstico de gestación, continuando con la revisión de la glándula lútea y la viabilidad del embrión. Para realizar las evaluaciones ultrasonográficas de la glándula lútea y las gestaciones se



utilizó un equipo de ultrasonido de tiempo real Aloka 210 con transductor lineal transrectal de 5Mhz.

A partir de los 35 días de la gestación las yeguas fueron divididas al azar en dos grupos: 11 yeguas en el grupo experimental y 13 yeguas en el grupo testigo. A las yeguas del grupo experimental se les administró altrenogest a una dosis de 0.088 mg/kg/día, que es el doble de la dosis normal, lo cual garantiza la supresión de la secreción de LH hipofisiaria (James *et al.*, 1998). El tratamiento diario con altrenogest se mantuvo hasta el día 70 de la gestación. Al grupo testigo no se le administró ningún tratamiento durante la gestación.

### DIAGRAMA DEL EXPERIMENTO



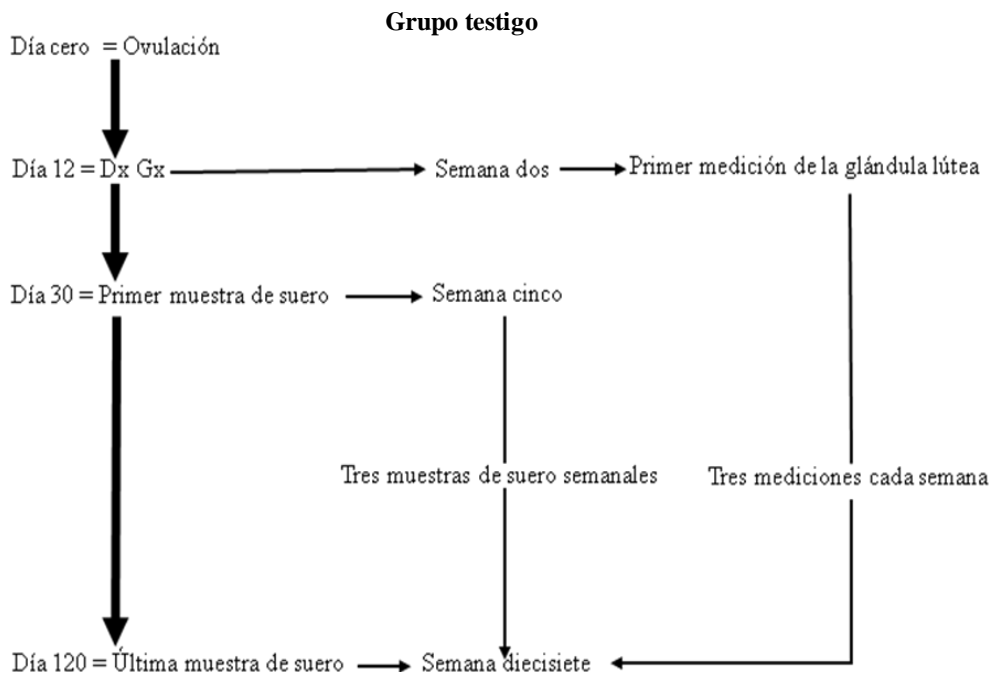


Fig. 5.1 En el diagrama se muestra el flujo de las actividades realizadas con el grupo experimental (altrenogest) y el testigo. (Dx Gx = Diagnóstico de gestación, Tx = Tratamiento con altrenogest)

### 5.3 Muestreo sanguíneo y procesamiento de muestras

Se recolectaron muestras de sangre dos veces por semana desde el 6° día post-ovulación hasta los 35 días de la gestación. A partir de este momento se comenzó a muestrear tres veces por semana hasta el día 120 de la gestación. Las muestras se obtuvieron mediante la punción yugular utilizando tubos al vacío con gel activador de la coagulación. El suero se separó del paquete celular mediante centrifugación a 3,000 rpm durante 10 minutos, para conservarse a -20°C, hasta el momento de realizar las determinaciones hormonales en el departamento de reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Las concentraciones de progesterona se determinaron con un radioinmunoanálisis de fase sólida (Coat-A-Count® Progesterona, Diagnostic Products Corporation, Los Ángeles, CA.,

USA) con una sensibilidad del  $0.1 \text{ ng.ml}^{-1}$  y coeficientes de variación intra e interensayo del 4 y 7 % respectivamente (Pulido *et al.*, 1991).

#### **5.4 Análisis estadístico**

Desde la ovulación hasta los 35 días se realizó una prueba de Anova de una vía para detectar diferencias entre semanas con respecto a las concentraciones de progesterona y el diámetro de la glándula lútea. Para establecer una relación entre el diámetro de la glándula lútea y la secreción de progesterona se realizó un análisis de regresión lineal en el que la progesterona actuó como factor dependiente y el diámetro de la o /las glándulas lúteas fue tanto para el grupo testigo como para el grupo experimental.

A partir de los 35 días y hasta el día 120 de la gestación se realizó un análisis de varianza en un diseño de mediciones repetidas con la finalidad de encontrar diferencias en las concentraciones plasmáticas de progesterona y diámetro de la glándula lútea entre los grupos, y en el caso de que fuera así se realizaron pruebas pos doc. (*t* de student). Los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza fueron probados en todos los casos. Todos los análisis fueron realizados en el programa JMP (versión 6).

Para evaluar el efecto del tratamiento sobre la formación de las glándulas lúteas, se evaluó con una prueba de G. Para evaluar la probabilidad de la formación de la glándula lútea entre el tratamiento y el grupo experimental se utilizó la prueba de Riesgo proporcional Cox. Los análisis se realizaron en el programa R (2.5.1) (R Development Core Team 2007). R development core team. 2007. R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. [www.R-project.org](http://www.R-project.org).

## 6. RESULTADOS

En la figura 6.1 se muestran las concentraciones plasmáticas de progesterona de acuerdo al número de glándulas lúteas que aparecieron en la gestación. Para el grupo experimental, se observa una tendencia a incrementarse las concentraciones de progesterona entre los días 49 a 77, cuando existían dos glándulas lúteas, a diferencia de cuando solo se presentaba una sola. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $F = 0.377$ ;  $P = 0.098$ ). En el grupo testigo no se evaluaron las diferencias debido a que solo existía una hembra con cuatro glándulas y otra con tan solo una.

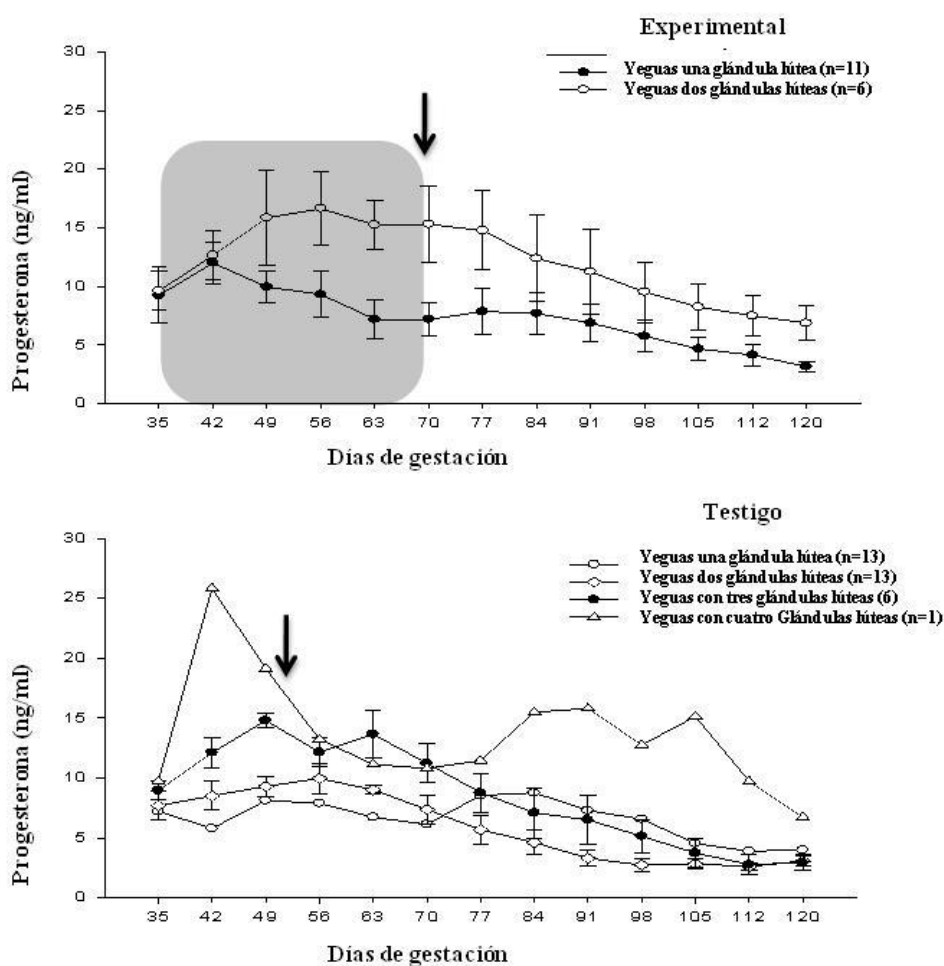


Figura 6.1 Concentraciones de progesterona en gestaciones con embrión mula, que durante el periodo de estudio acumularon 2,3 ó 4 glándulas lúteas. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar. La flecha indica el día promedio de la aparición de la primera glándula lútea accesoria. La zona sombreada representa la duración del tratamiento.

En la figura 6.2 se muestra el porcentaje de glándulas lúteas secundarias que aparecieron durante la administración del progestágeno (35-70 días de gestación). Se observa que en el grupo experimental tan solo el 18% de las yeguas formaron por lo menos una glándula lútea accesoria, mientras que en el testigo lo hizo el 84% de los animales.



Figura 6.2 Porcentaje de aparición de la glándula lútea secundaria durante el periodo que se administró el altrenogest.

En la figura 6.3 se muestra el número de glándulas lúteas acumuladas para ambos grupos, destacando que en el grupo experimental acumuló tan solo dos, mientras que el testigo acumuló hasta cuatro.

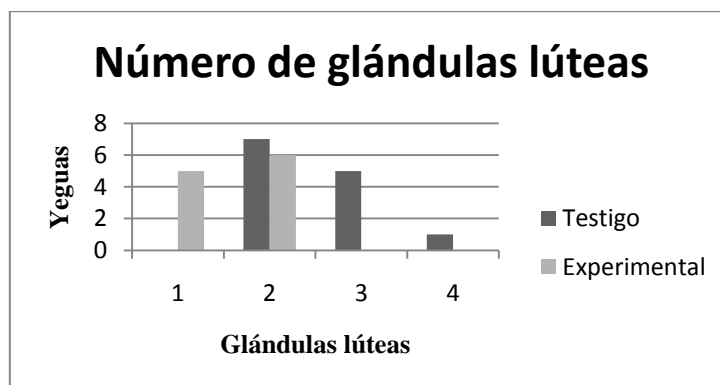


Figura 6.3 Número de yeguas que acumularon 1, 2, 3 ó 4 glándulas lúteas durante los primeros 120 días de gestación.

La figura 6.4 muestra el diámetro promedio de la glándula y las concentraciones de progesterona registradas en las yeguas desde el 7° día postovulación hasta el día 35 de la gestación, momento en el cual comenzó el tratamiento con progestágenos. No se encontraron diferencias estadísticas en el diámetro promedio entre semanas durante este periodo ( $F = 1.297$ ;  $P = 0.283$ ). En el caso de las concentraciones de progesterona, alcanzaron sus máximas concentraciones en el día 14 de la gestación ( $F = 4.09$ ;  $P = 0.006$ ).

#### Glándula lútea y progesterona al día 35

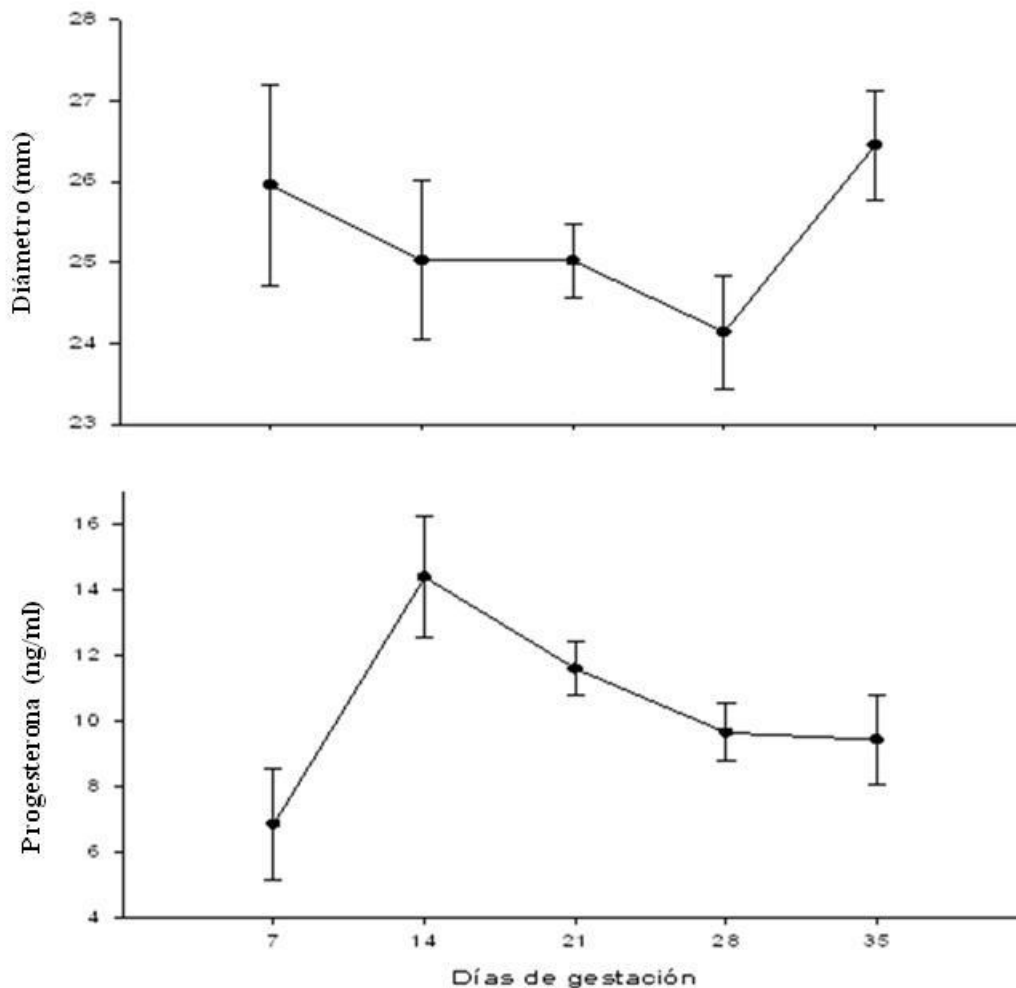


Figura 6.4 Diámetro promedio de la glándula lútea y concentraciones de progesterona presentadas entre los 7 y 35 en yeguas gestantes con embrión mula. Las barras representan el error estándar.

En la figura 6.5 se observan las concentraciones promedio de progesterona del grupo experimental y el grupo testigo desde el día 35 hasta el 120 de la gestación, las cuales no fueron estadísticamente diferentes entre grupos en ninguna semana ((P= 0.129). Las concentraciones de progesterona en el grupo experimental y testigo comenzaron a elevarse a partir del día 35, alcanzando su pico de secreción en el día 56 (13.30 ng/ml) y 49 (11.08 ng/ml) respectivamente.

### Progesterona al día 120

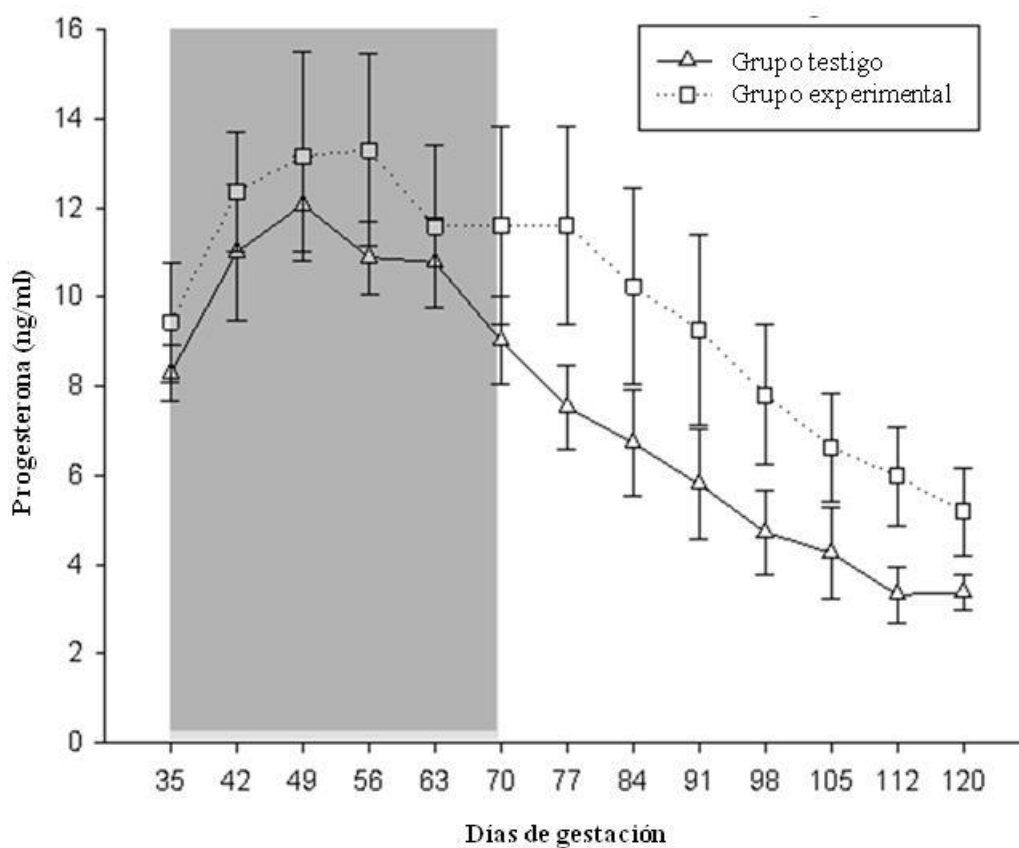


Figura 6.5 Concentraciones de progesterona del día 35 al 120 de la gestación en yeguas gestantes con feto mula, tratadas o sin tratar con altrenogest. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar. La zona sombreada representa la duración del tratamiento con altrenogest. Las diferencias entre grupos no son significativas ( $p > 0.05$ ).

En la figura 6.6 se presentan por separado las concentraciones de progesterona de cada grupo con el objeto mostrar las comparaciones entre semanas del mismo grupo. Se encontraron diferencias significativas entre los días de gestación en ambos grupos ( $P < 0.0001$ ). En el grupo testigo se observa que las concentraciones de progesterona alcanzan su máximo nivel en día 49 para después descender paulatinamente. En el día 49 las concentraciones son significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) que en el día 35 y que después del día 70, siendo estas últimas mayores a las encontradas a partir del día 91. En el caso del grupo experimental las concentraciones máximas se encuentran en el día 49 y 56, siendo mayores a las encontradas en el día 91.

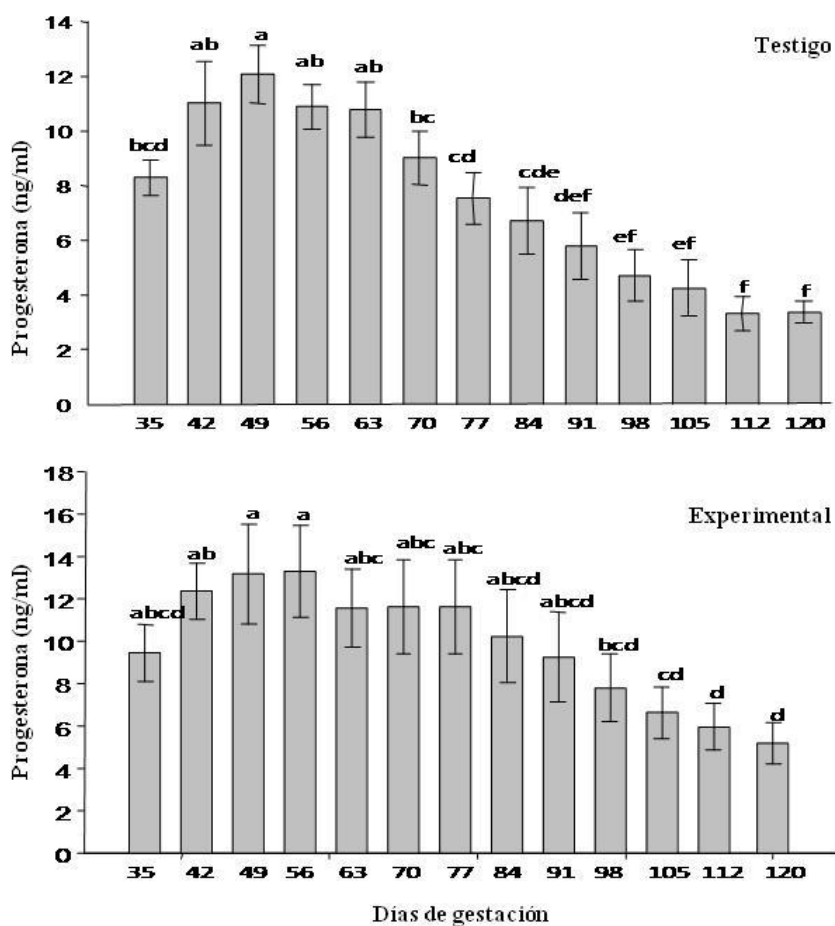


Figura 6.6 Concentraciones de progesterona en yeguas gestantes con feto mula, tratadas o sin tratar con altrenogest. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar. Dentro de cada grupo, los valores que no comparten por lo menos una literal son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).



En la figura 6.7 se muestran los diámetros promedio de la glándula lútea primaria durante los primeros 120 días de gestación entre el grupo experimental y el testigo. No hubo diferencias significativas entre grupos ( $P = 0.082$ ). Sin embargo, se detectaron diferencias significativas entre los días de gestación, independientemente de a qué grupo pertenecían ( $P = 0.041$ ) (Fig. 6.8).

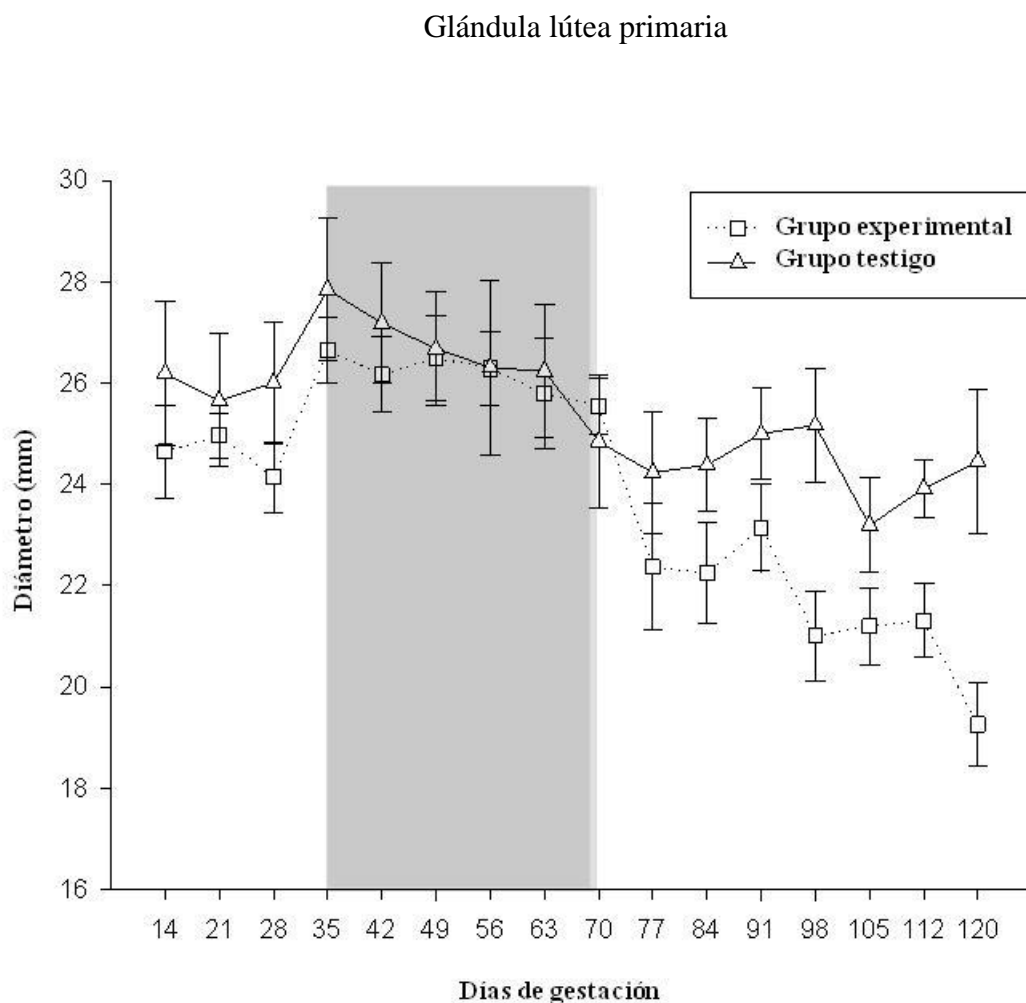


Figura. 6.7 Diámetro promedio de la glándula lútea primaria entre el 14 y 120 días de gestación en yeguas con feto mula, tratadas o sin tratar con altrenogest. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar. La zona sombreada la duración del tratamiento con altrenogest. Las diferencias entre grupos no son significativas ( $p > 0.05$ ).

En la figura 6.8 se muestran las diferencias de diámetro de la glándula lútea entre semanas dentro de cada grupo. En el día 35 en el grupo tratado con altrenogest la glándula lútea

aumentó un 12% su diámetro y para el día 70 comenzó a disminuir hasta el día 120. Destaca el hecho de que en este grupo entre el día 28 y el 35 se registró un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en el diámetro, mientras que entre el día 70 y el 77 se produjo un descenso significativo ( $p < 0.01$ ). En el caso del grupo control no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los días de gestación ( $F = 1074$ ;  $P = 0.382$ ).

### Glándula lútea

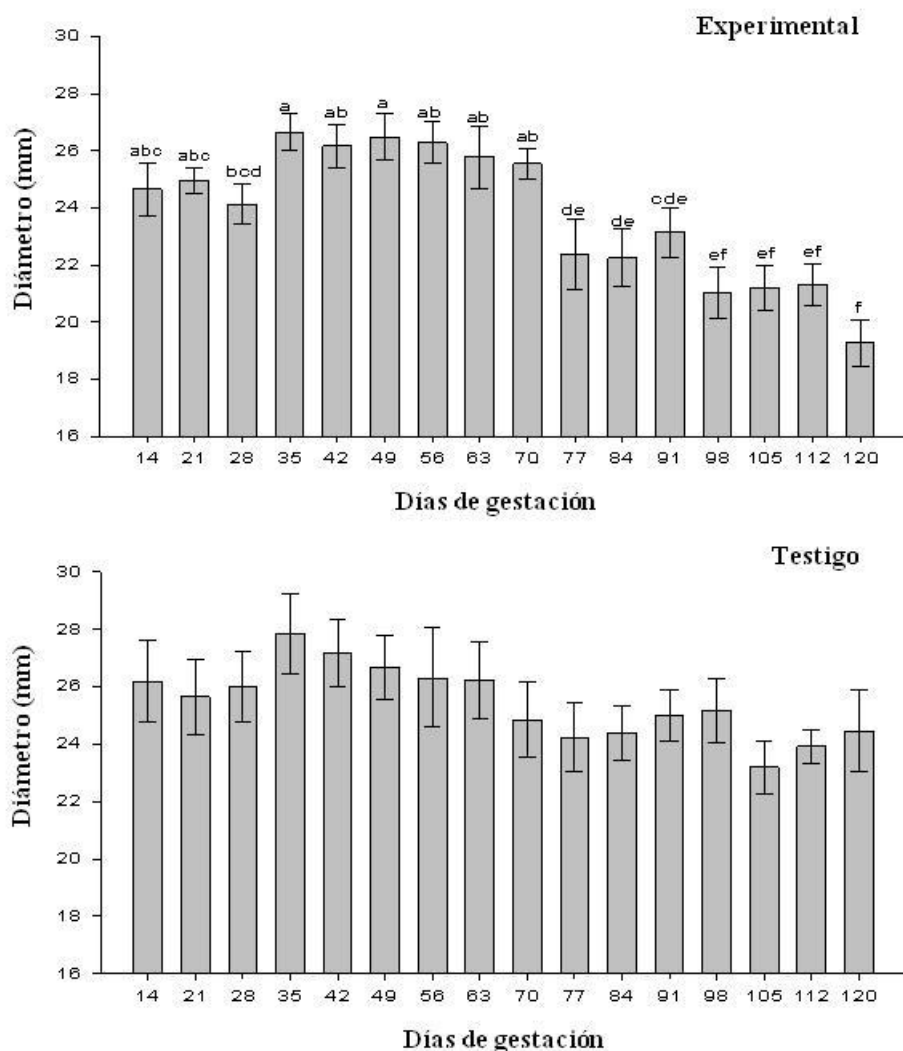


Figura 6.8 Diámetro de la glándula lútea primaria entre el día 14 al 120 de gestación de yeguas con feto mula. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar. En el grupo experimental los valores que no comparten al menos una literal son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). En el grupo testigo las diferencias entre semanas no son significativas ( $p > 0.05$ ).

En la figura 6.9 se muestra la correlación entre las concentraciones promedio de progesterona y el diámetro promedio de las glándulas lúteas sumadas de cada yegua durante el estudio. Para el caso del grupo experimental el 59 % de la variación en las concentraciones de progesterona fue explicada por el modelo ( $F= 13.41$ ;  $P = 0.0052$ ), mientras que en el caso del grupo control el modelo explicó el 55 % de la variación ( $F = 13.53$ ;  $P = 0.003$ ).

### Regresión lineal

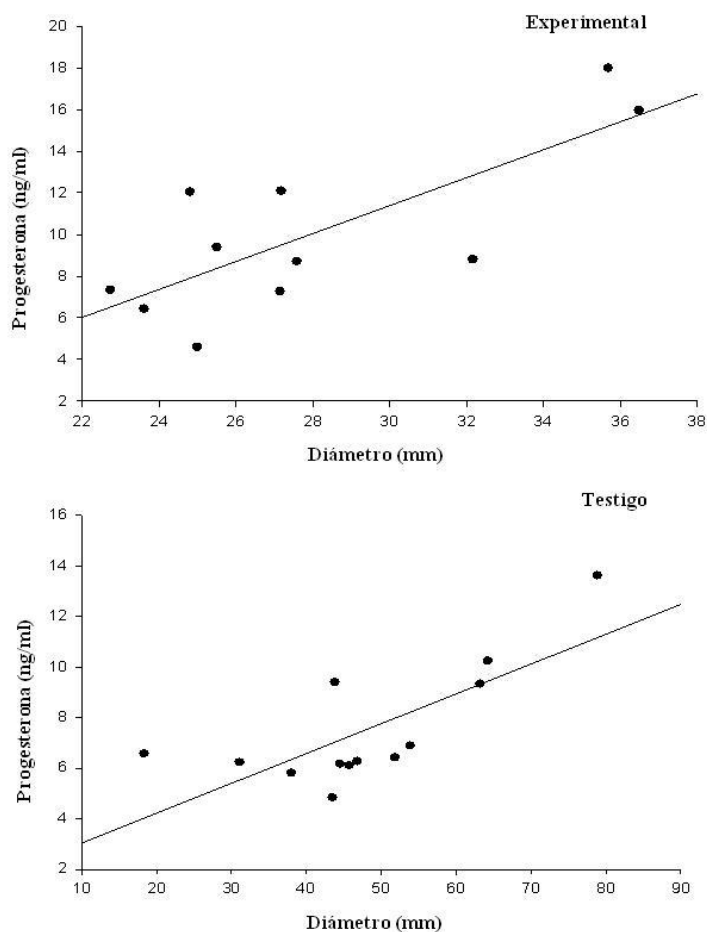


Figura 6.9 Regresión lineal que muestra los diámetros sumados de las glándulas lúteas que presentan cada yegua y las concentraciones plasmáticas de progesterona en yeguas gestantes con feto mula tratadas o sin tratar con altrenogest.

En la figura 6.10 se muestra el promedio de glándulas lúteas acumuladas durante el estudio. En el grupo testigo se acumularon en promedio  $2.46 \pm 0.18$  glándulas lúteas, mientras que en el grupo tratado con altrenogest, que tan solo acumularon  $1.53 \pm 0.18$  estructuras lúteas, siendo la diferencia altamente significativa ( $P < 0.001$ )

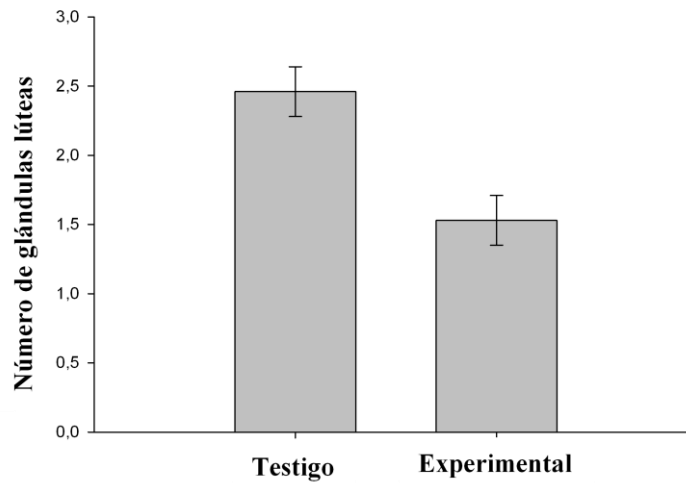


Figura 6.10 Número en promedio de glándulas lúteas que se acumularon en gestaciones con feto mula en yeguas tratadas o sin tratar con altrenogest. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar.

Los resultados mostraron que el curso temporal de la formación de una glándula lútea suplementaria varió entre en control y el experimental ( $\chi^2 = 6.3$ ,  $P = 0.01$ ). El tratamiento con altrenogest reduce la probabilidad de formar una glándula lútea suplementaria 3.55 veces ( $Z = 2.30$ ;  $P = 0.02$ )

## 7. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que el tratamiento con altrenogest disminuye la aparición de las glándulas lúteas suplementarias mientras se mantenga el tratamiento, ocurriendo en promedio solamente después de retirar el tratamiento (figura 6.1, 6.2, 6.3) y las concentraciones plasmáticas de progesterona se incrementaron de acuerdo al número de glándulas lúteas acumuladas en los primeros 120 días de gestación (figura 6.1), lo que coincide con estudios previos que reportan que la producción de progesterona depende entre otros factores de la masa del tejido lúteo (Boeta, 2008, Ginther *et al.*, 2007, Ginther, 1992, Voller *et al.*, 1991, Martin *et al.*, 1989, Stewart y Allen, 1981).

También se confirman los informes previos (Holtan *et al.*, 1975; Ginther, 1992; Boeta y Zarco, 2005, 2010; Boeta, 2008), que señalan que en la yegua gestante las concentraciones de progesterona declinan en forma gradual desde la tercera hasta la quinta semana de la gestación (figura 6.4), cuando se produce un repunte debido tanto a la resurgencia de la glándula lútea primaria ó en algunos casos debido a la formación de glándulas lúteas accesorias (figuras 6.5 y 6.6). Se confirma también que durante los primeros 35 días de gestación el diámetro de la glándula lútea se mantiene sin diferencias significativas (figura 6.4) (Bergfelt *et al.*, 1989).

En la figura (6.5) se observa que, aunque las diferencias entre grupos no fueron significativas, las concentraciones de progesterona tendieron a ser mayores en el grupo tratado con altrenogest que en el grupo testigo, a pesar de que en este último se formó un número significativamente mayor de glándulas lúteas accesorias (figuras 6.3, 6.5, 6.6 y 6.10) y también a pesar de que, dentro de cada grupo, las concentraciones de progesterona aumentaron conforme aumentaba el número de glándulas lúteas (figura 6.1). También se debe resaltar el hecho de que, dentro del grupo experimental, las concentraciones de

progesterona se mantuvieron en sus máximos niveles entre los días 35 y 70, precisamente cuando las yeguas estaban recibiendo altrenogest. Todo lo anterior no concuerda con la hipótesis del presente trabajo, que se postulaba que, al inhibir el altrenogest la secreción de LH hipofisiaria en yeguas con gestación mular (con muy poca producción de eCG) se produciría una depresión de la función lútea (figuras 6.5, 6.6, 6.7). La capacidad del altrenogest para inhibir LH a niveles basales en la yegua ha sido demostrada (Lee, 2003, James *et al*, 1998), por lo que una posible explicación de los resultados encontrados en el presente trabajo puede ser que el método de radioinmunoensayo utilizado presente un cierto grado de reacción cruzada con el altrenogest, lo que haría que parte de la “progesterona” detectada haya sido en realidad altrenogest. Otra alternativa sería que una vez formadas, las glándulas lúteas de la gestación requieran niveles basales de LH para continuar funcionando, por lo que en ambos grupos siguieron funcionando, registrándose solamente variaciones aleatorias entre los grupos. Ambas posibilidades deben investigarse en trabajos específicamente diseñados para ese fin.

En trabajos previos realizados en yeguas gestantes con embrión equino se ha observado que la administración de un progestágeno exógeno no interfiere con las concentraciones endógenas de progesterona (Jackson *et al.*, 1985, Squires *et al.*, 1983), asumiéndose que eso se debe a que la acción luteotrópica de la eCG compensa por la inhibición de la secreción de LH hipofisiaria. Sin embargo, el presente trabajo fue realizado en yeguas gestantes con embrión mula, en las que las concentraciones de eCG son mucho menores y generalmente regresan a niveles basales antes del día 70 de la gestación (Urias, 2008, Boeta y Zarco, 2005; 2010), por lo que se esperaba que la inhibirse la secreción de LH se produjera una disminución de la función lútea.

La resurgencia de la glándula lútea primaria (Bergfelt *et al.*, 1989) en el presente trabajo ocurrió a partir del día 35, cuando las concentraciones de progesterona comenzaron a elevarse en ambos grupos (figura 6.5.), presentándose una elevación significativa en el día 49 y 56 del grupo experimental, mientras que en el testigo solo se presentaron diferencias en el día 49 (figura 6.6). La respuesta lútea también se manifestó en el incremento en diámetro de la glándula lútea (figura 6.7). A pesar de la administración de altrenogest en yeguas gestantes con secreción deficiente de eCG (feto mula) la glándula lútea no mostró ninguna diferencia en cuanto a tamaño ni producción de progesterona con respecto al grupo que no recibió ningún tratamiento. La falta de diferencia entre grupos en el diámetro de las glándulas lúteas, y su buena correlación con las concentraciones de progesterona, sugiere que en realidad las glándulas lúteas del grupo experimental siguieron funcionando en forma normal, y hace menos probable la posibilidad de que el ensayo haya tenido reacción cruzada con el altrenogest.

Allen *et al.*, 1987, reportó que en yeguas a las que se les transfiere un embrión burro, y que por lo tanto no producen eCG, la glándula lútea primaria se mantiene funcionando hasta por los primeros 3 meses de la gestación. Las yeguas con gestación mular utilizadas en el presente trabajo, aunque tienen concentraciones muy bajas de eCG (Boeta y Zarco, 2005; 2008), no son totalmente deficientes en dicha hormona (como las gestantes con embrión burro). Esto podría indicar que concentraciones muy bajas de eCG pueden ser suficientes para mantener la función lútea entre el día 35 y 70 de la gestación aún con la disminución de LH provocada por la retroalimentación negativa con altrenogest.

En este estudio, se observó una relación positiva entre el diámetro total de la glándula lútea ó las glándulas lúteas y las concentraciones periféricas de progesterona (figura 6.9) lo que confirma que la producción de progesterona depende entre otros factores de la masa

o del diámetro lúteo. (Boeta, 2008, Ginther *et al.*, 2007, Ginther, 1992, Voller *et al.*, 1991, Martin *et al.*, 1989, Stewart y Allen, 1981).

Aunque como se mencionó anteriormente el efecto inhibitorio del progestágeno sobre la LH no afectó la función de la glándula lútea primaria, si evitó en la mayoría de los casos la formación de glándulas lúteas accesorias, por lo que el número total de cuerpos lúteos presentes acumulados durante la gestación fue mucho menor en las yeguas del grupo experimental que en las yeguas del grupo testigo (figura 6.10). Se sabe que los progestágenos exógenos no suprimen la secreción de FSH, por lo que el desarrollo folicular continua dándose en oleadas en yeguas tratadas con estas hormonas (Allen y Urwin, 1980). Tradicionalmente se ha considerado que la eCG es responsable de la ovulación y/o luteinización de estos folículos, lo que explica que la primera glándula lútea accesoria se forme a partir del día 35 de la gestación, cuando las concentraciones de eCG se elevan (Bergfelt *et al.*, 1989). Sin embargo, los resultados del presente trabajo sugieren que, al menos en yeguas con poca producción de eCG (como las gestantes con embrión mula), la secreción de LH hipofisiaria puede ser fundamental para que se produzca la ovulación y/o luteinización folicular, ya que este fenómeno raramente ocurre si se inhibe la secreción de LH con altrenogest.

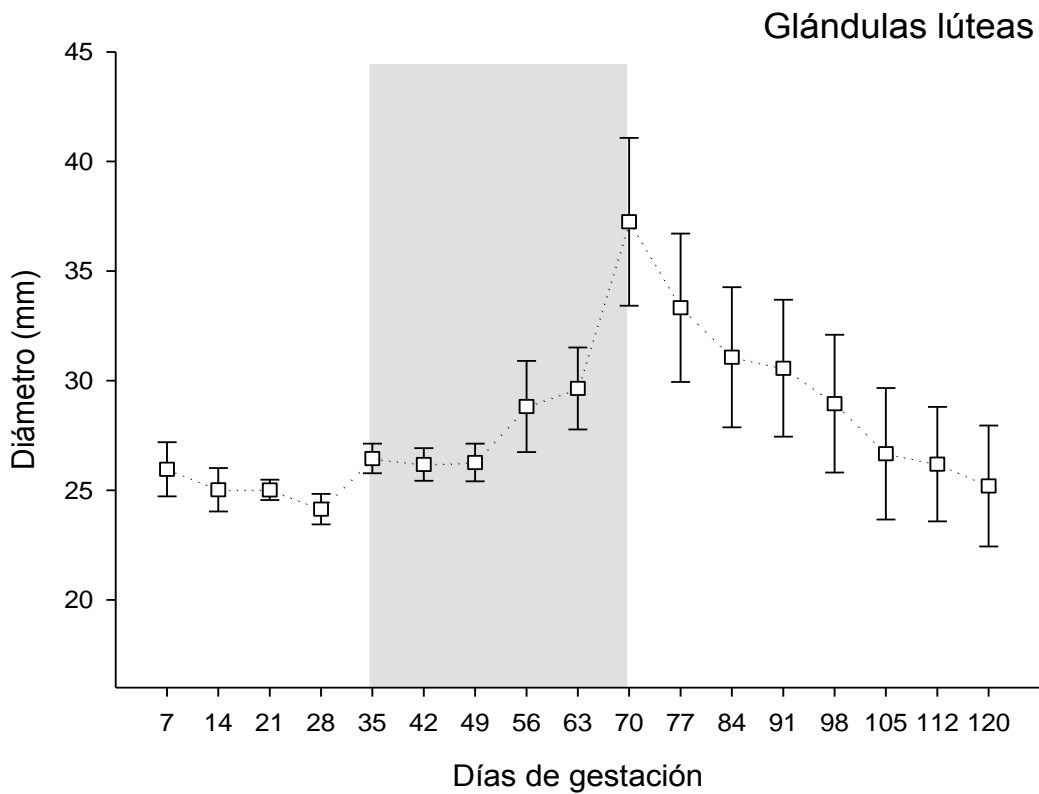
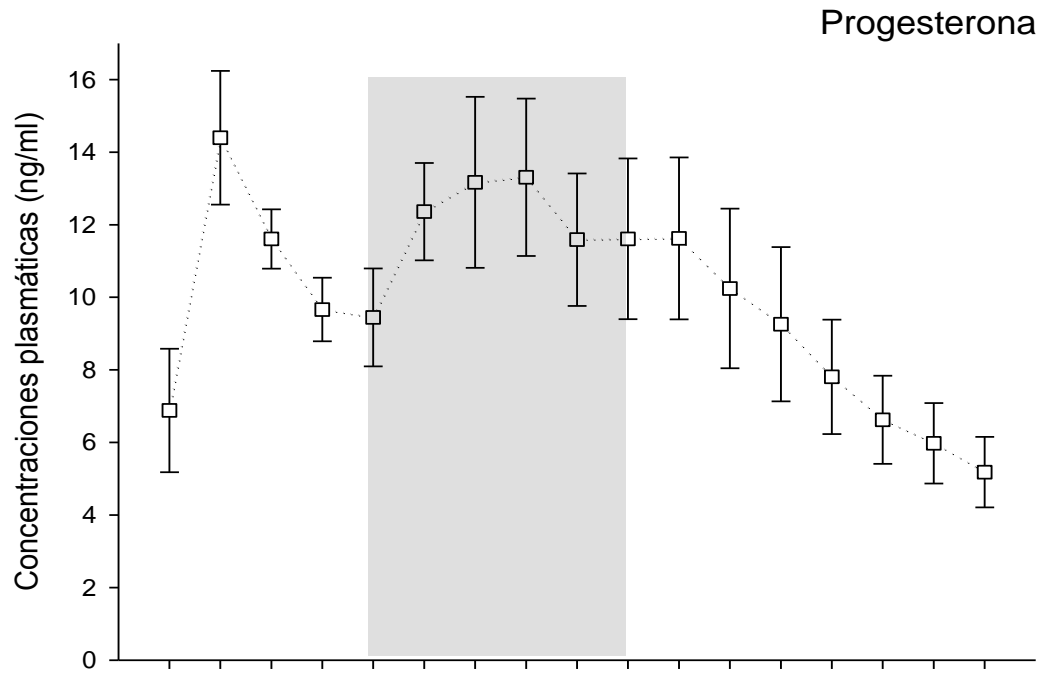
La administración del altrenogest, en yeguas con gestación mular reduce en 3.55 veces la probabilidad de formar nuevas glándulas lúteas, Dichas diferencias hacen sugerir que en las gestaciones con embrión mula la formación de glándulas lúteas suplementarias son producidas por una colaboración estrecha entre la LH y la eCG.



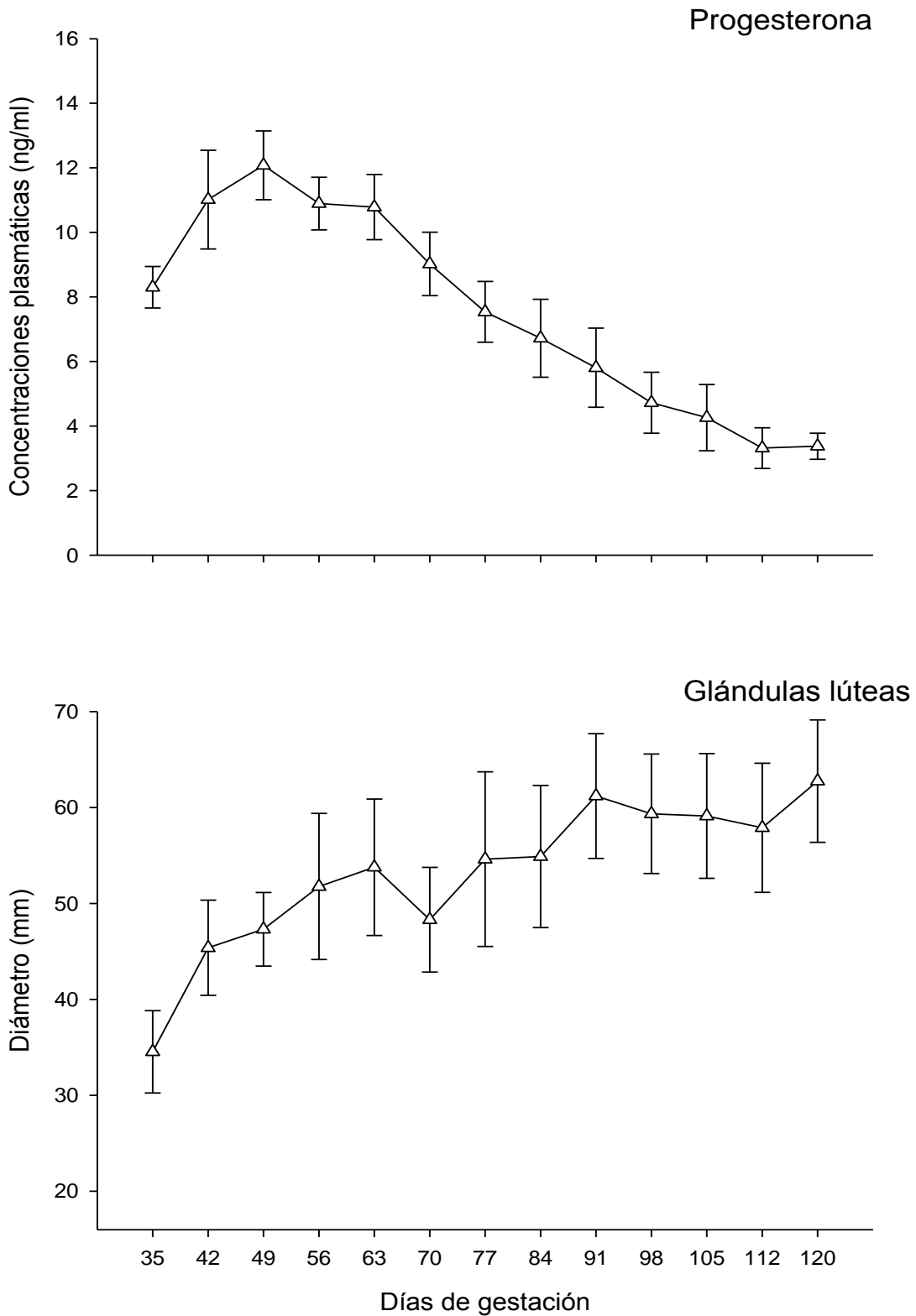
## **8. CONCLUSIONES**

Los resultados del presente trabajo apoyan la hipótesis de que el tratamiento con progestágenos exógenos en yeguas con gestaciones mulares no inhibe la función de la glándula lútea primaria ni evita su resurgencia en el día (día 35), pero sí reduce en 3.55 veces la probabilidad de formar una glándula lútea suplementaria. Lo anterior sugiere que las bajas concentraciones de eCG presentes en las gestaciones mulares pueden ser suficientes para mantener la función lútea pero no para producir la formación de nuevas glándulas lúteas.

**9. ANEXO- DE GRAFICAS CON PERFILES HORMONALES Y MEDIDAS LÚTEAS NO INCLUIDAS EN EL CUERPO DEL CAPÍTULO 6.**



9.1 Concentraciones de progesterona y diámetro de las glándulas lúteas acumuladas para el grupo experimental.



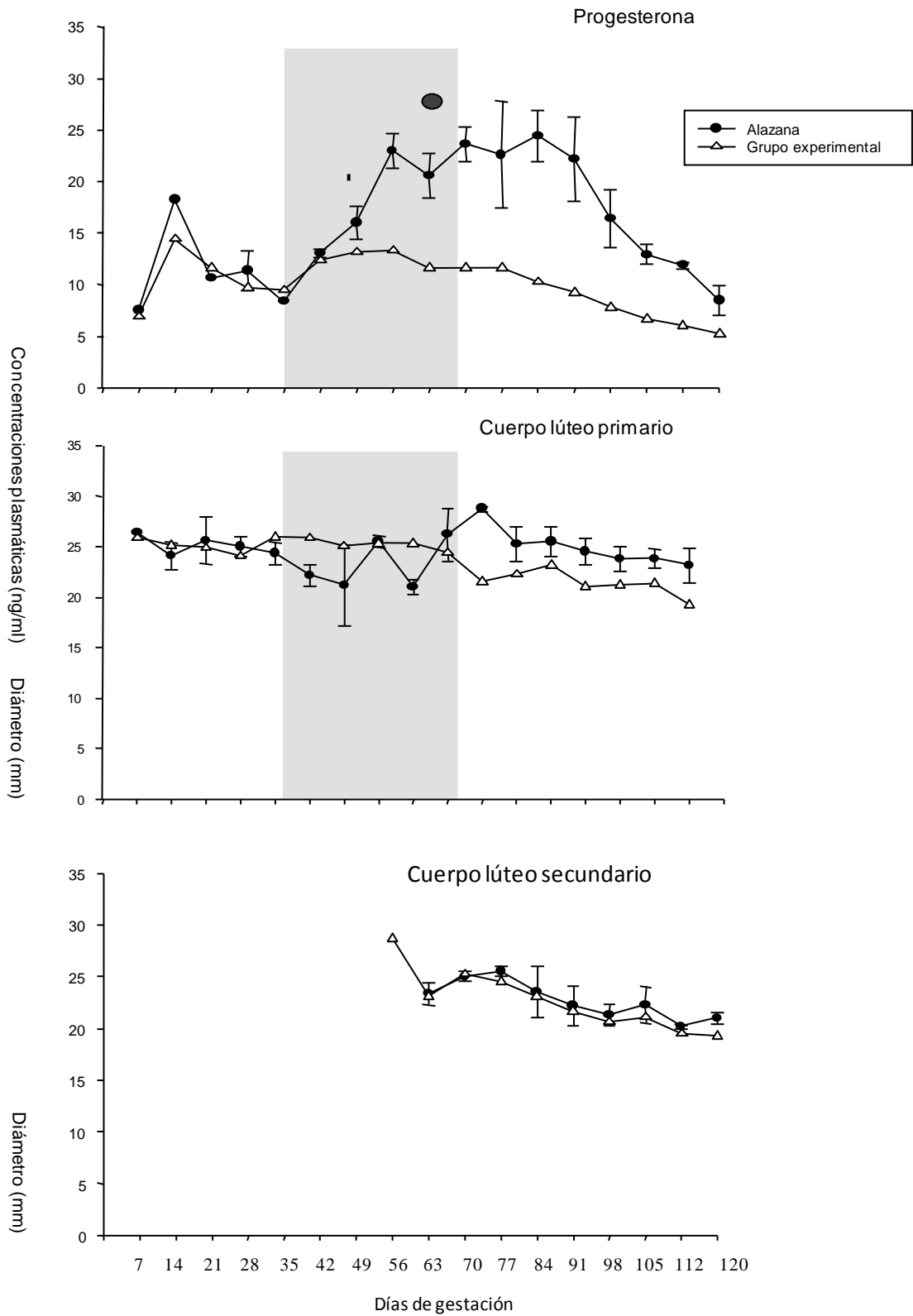
9.1

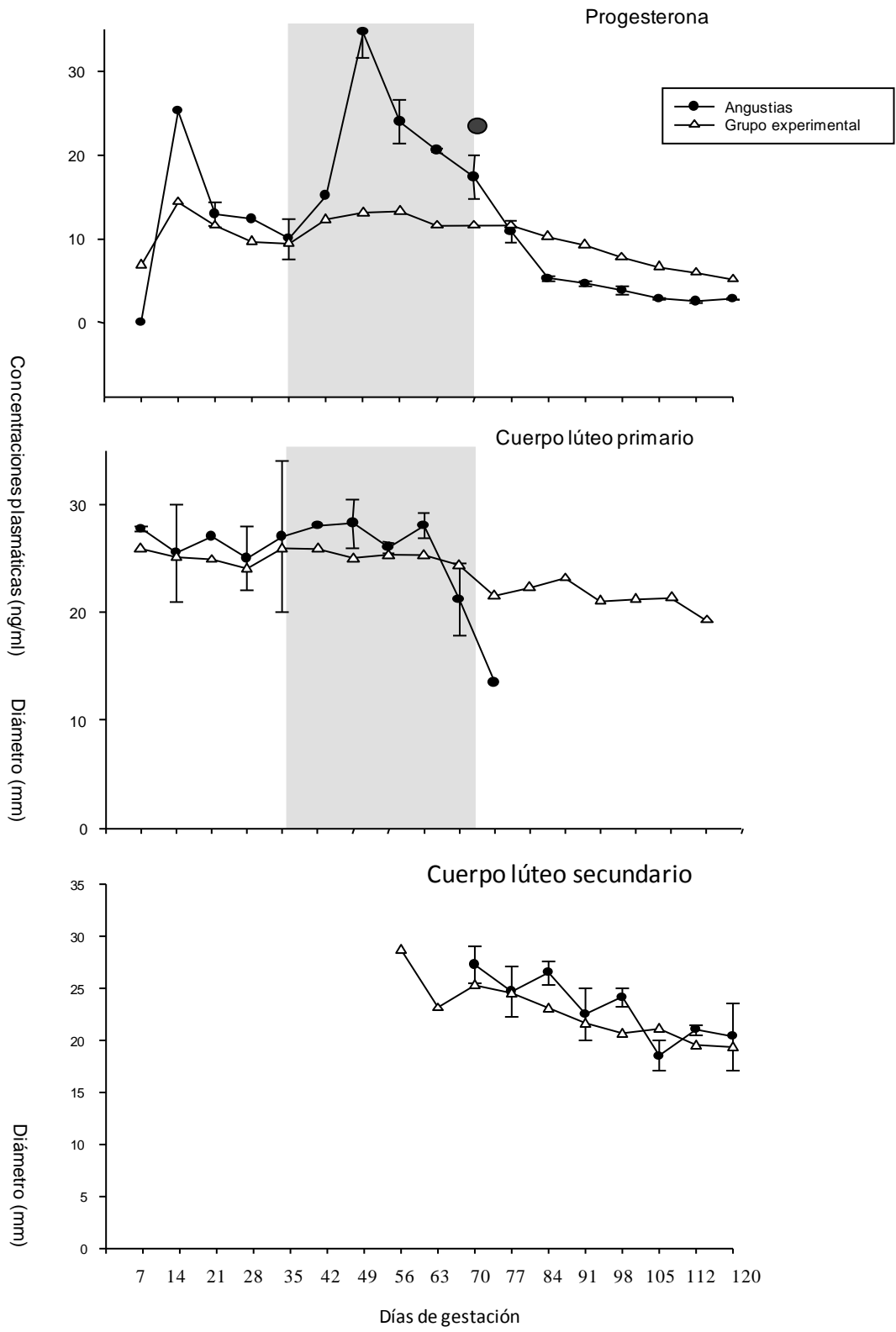
YEGUAS

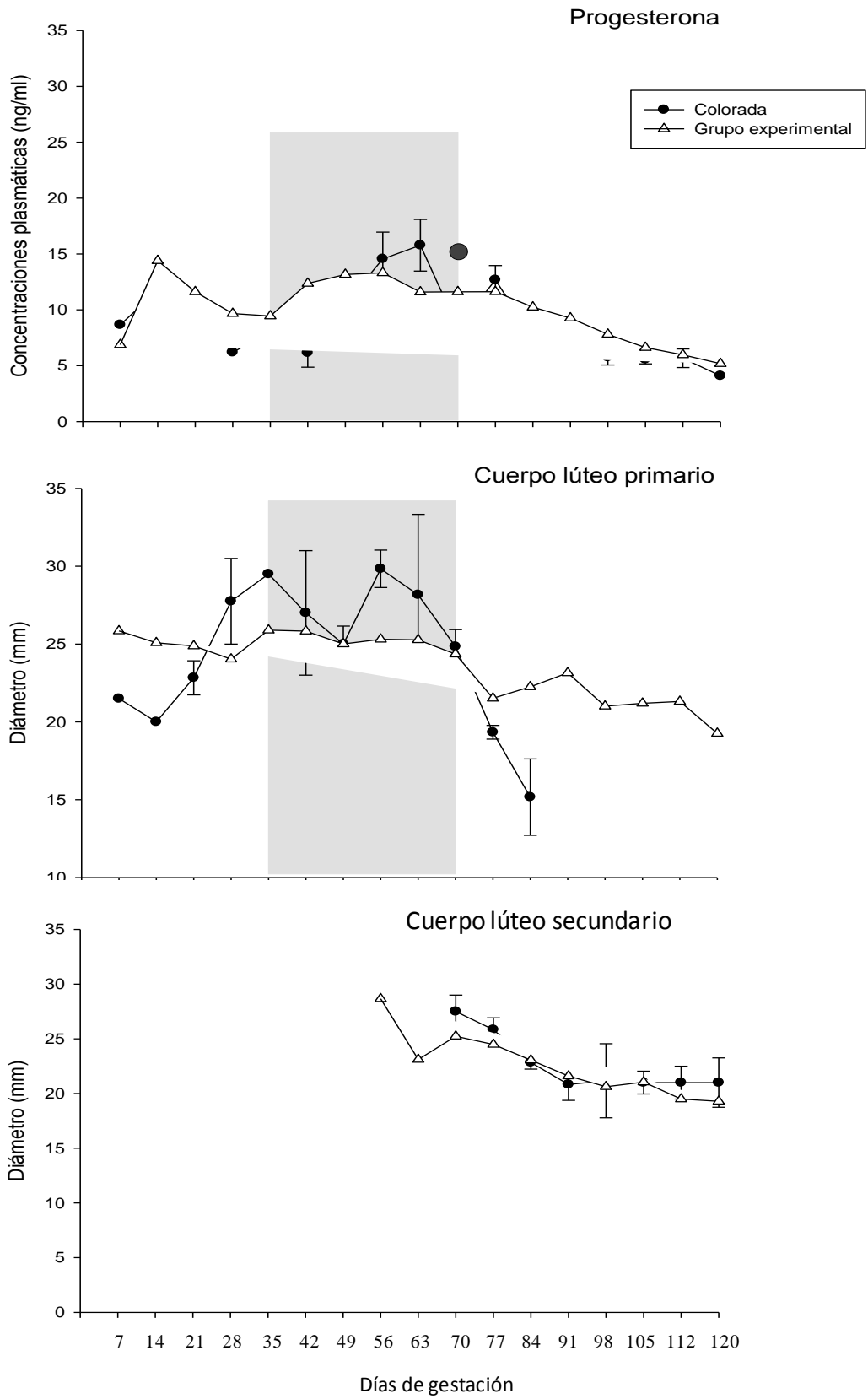
DEL

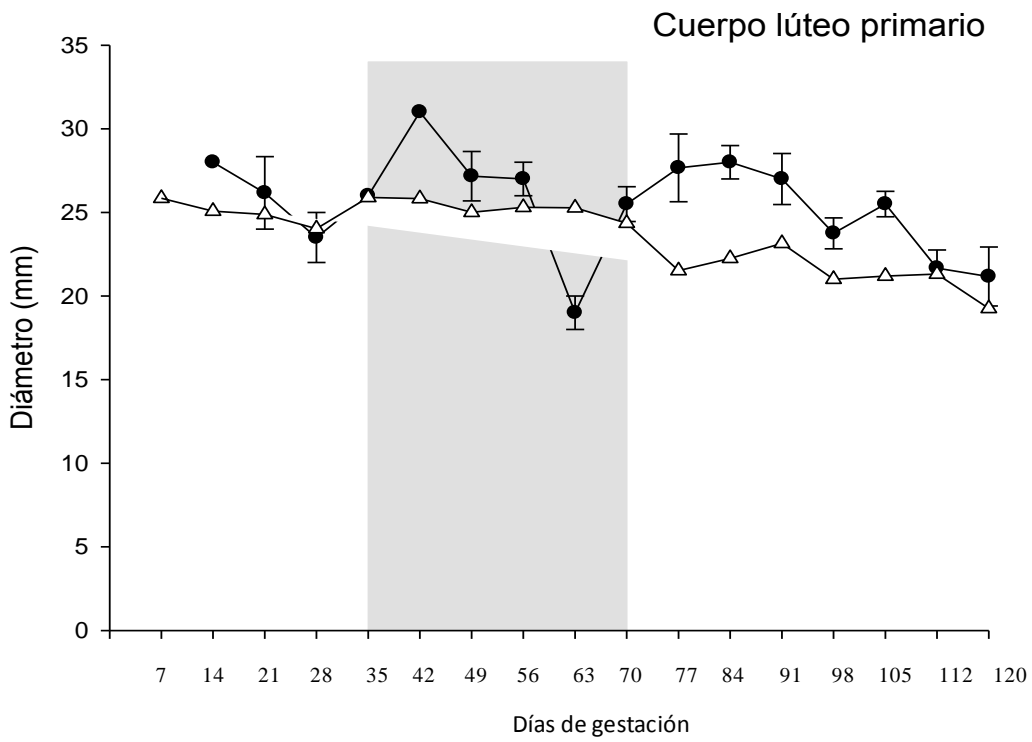
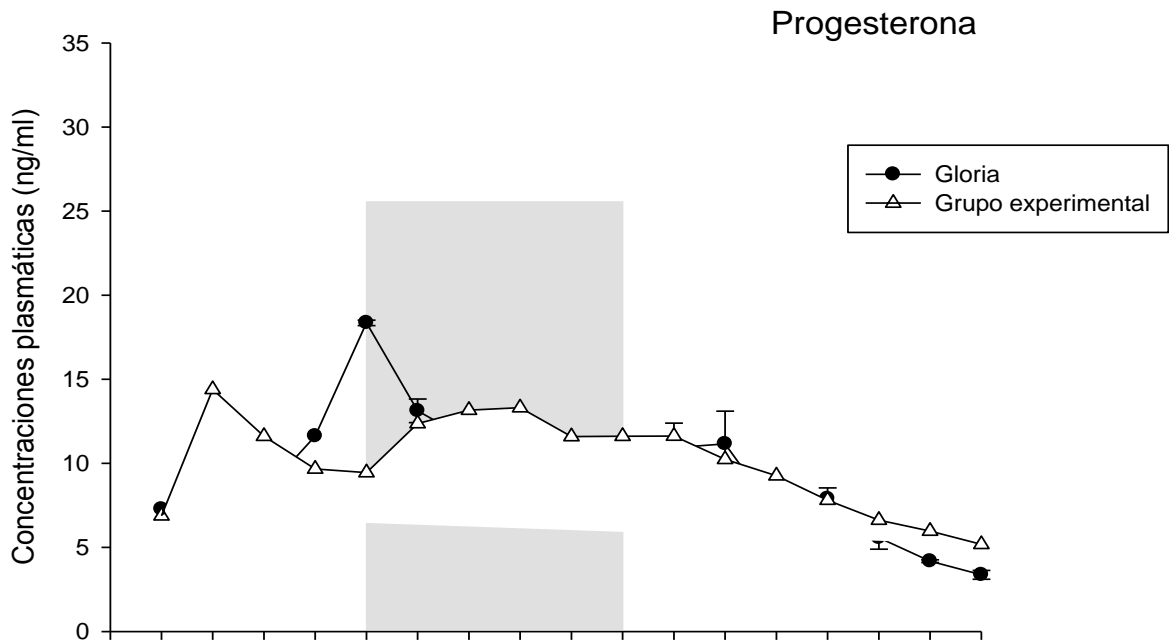
GRUPO

EXPERIMENTAL

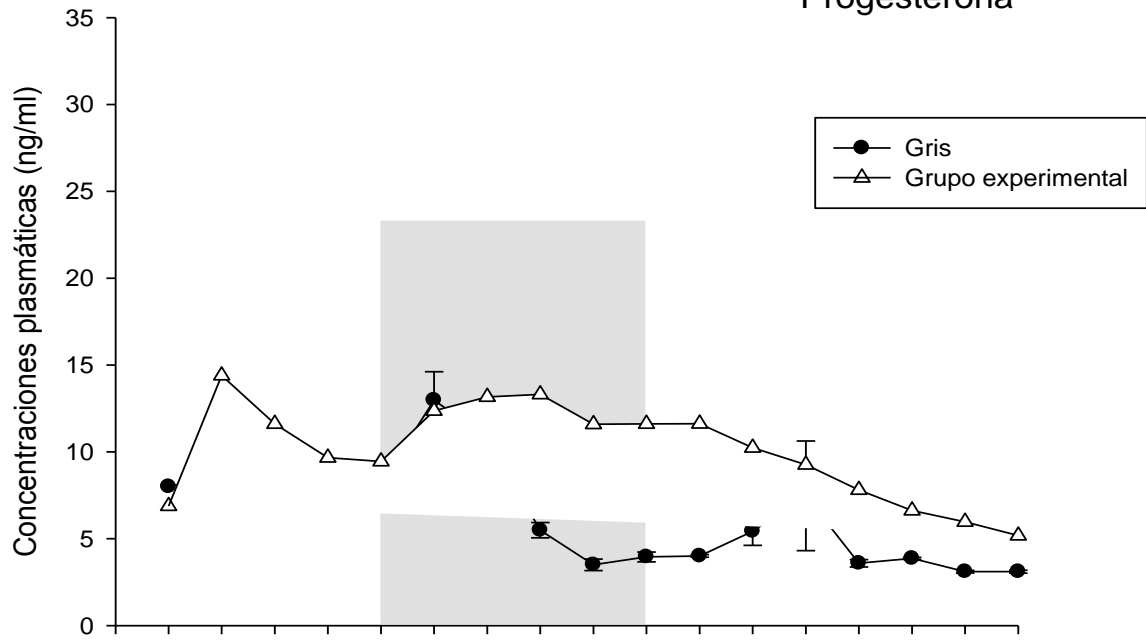




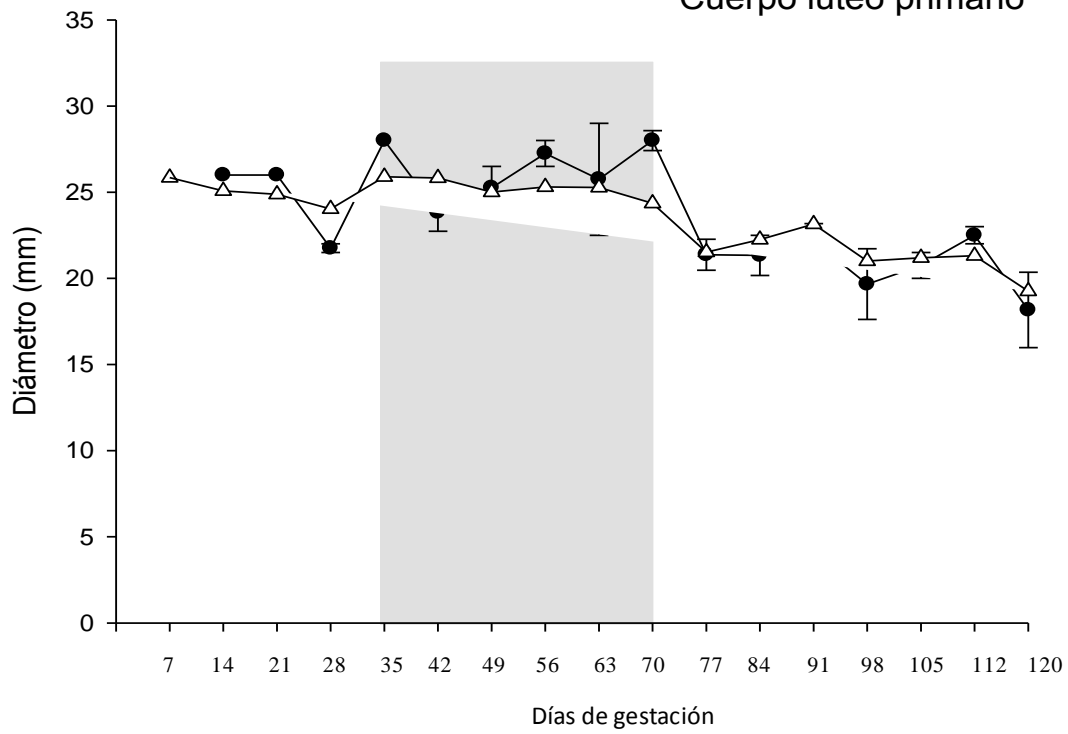




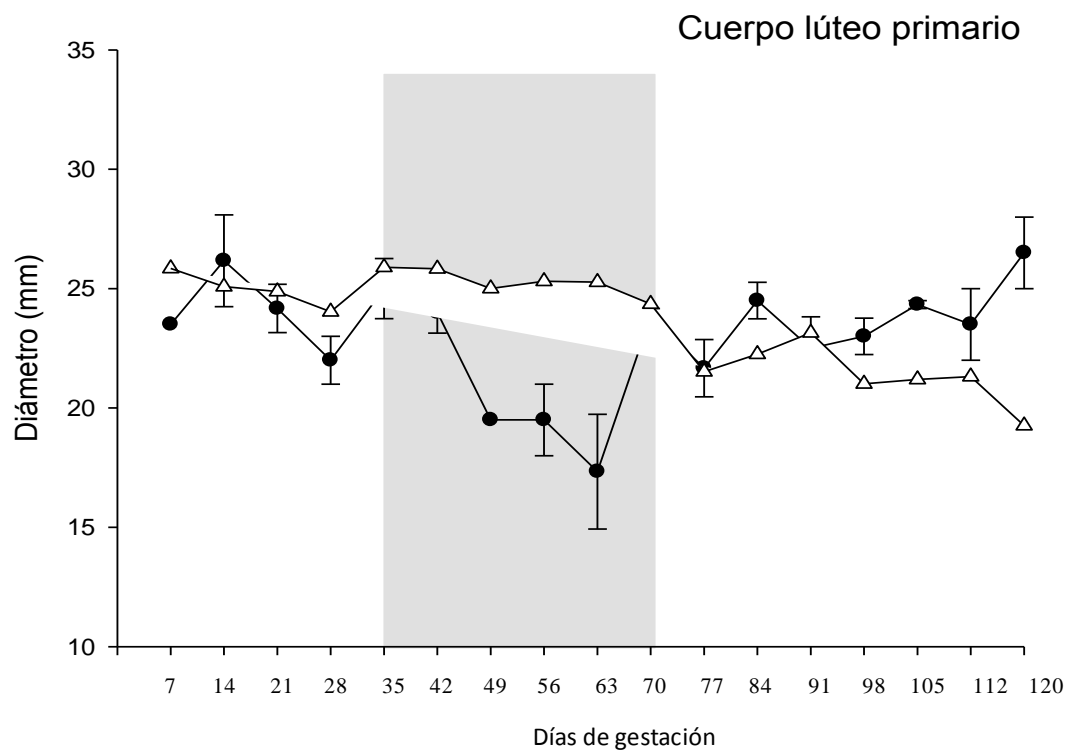
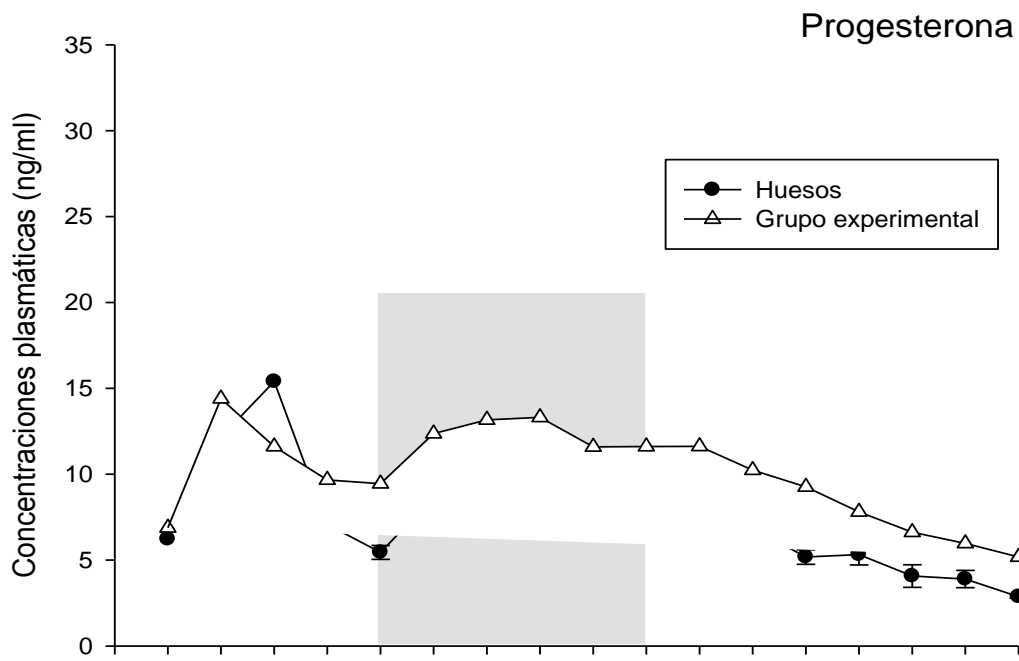
### Progesterona

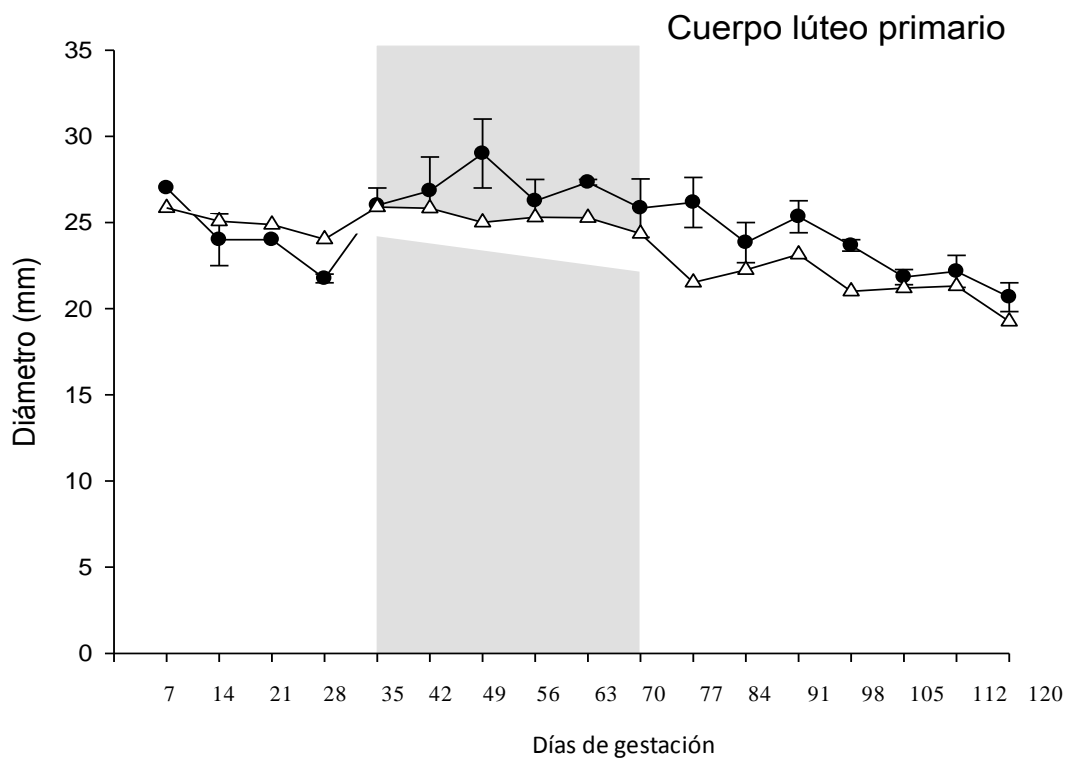
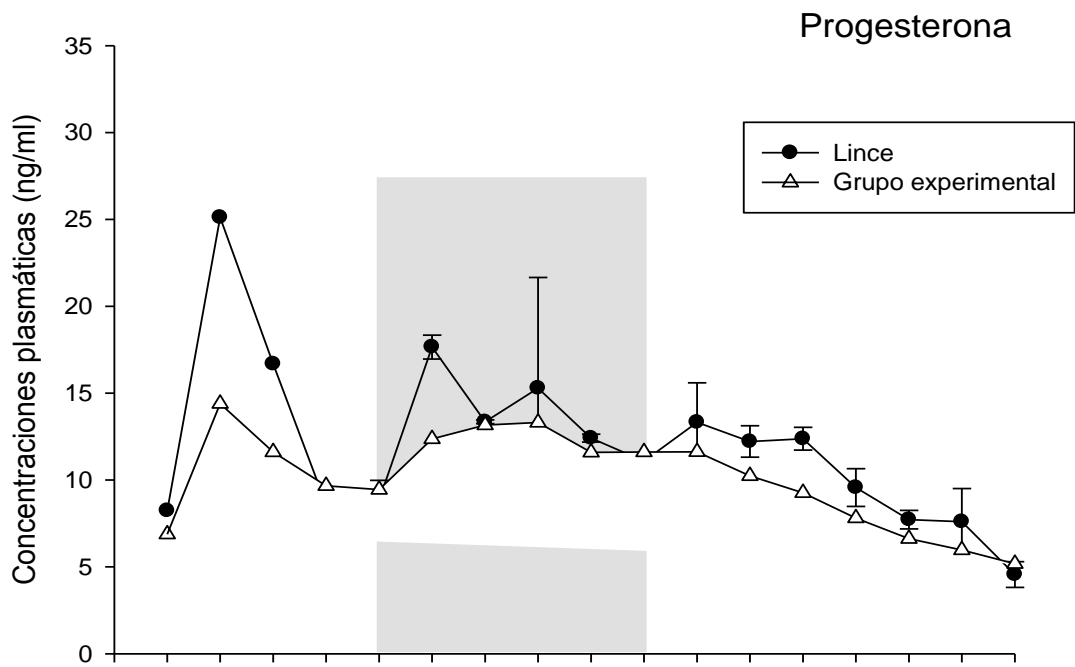


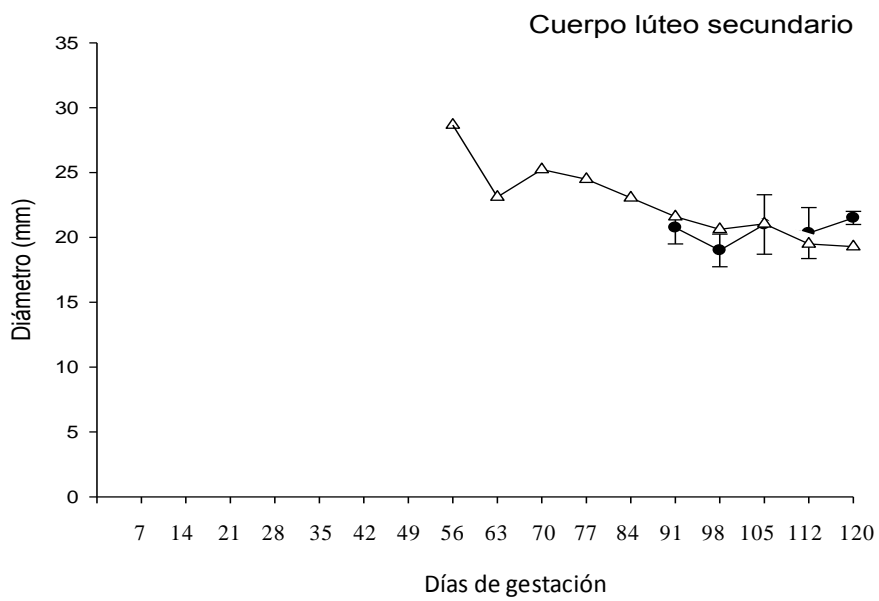
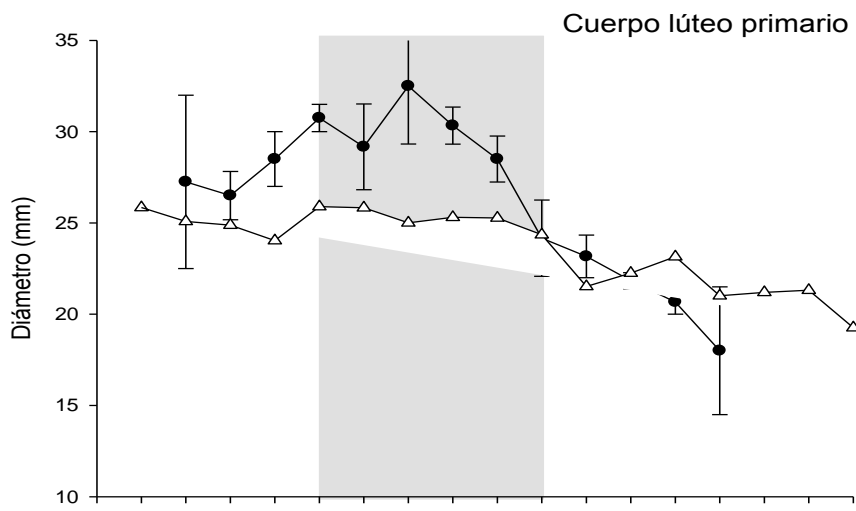
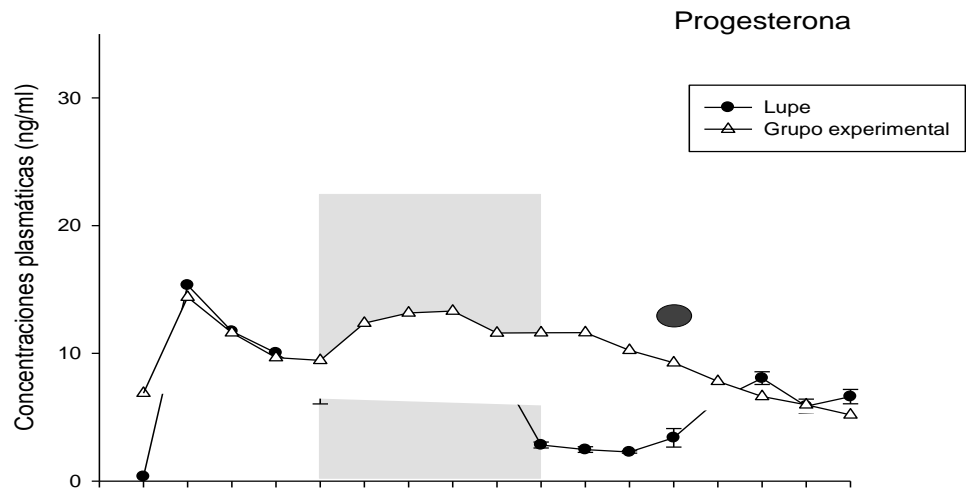
### Cuerpo lúteo primario

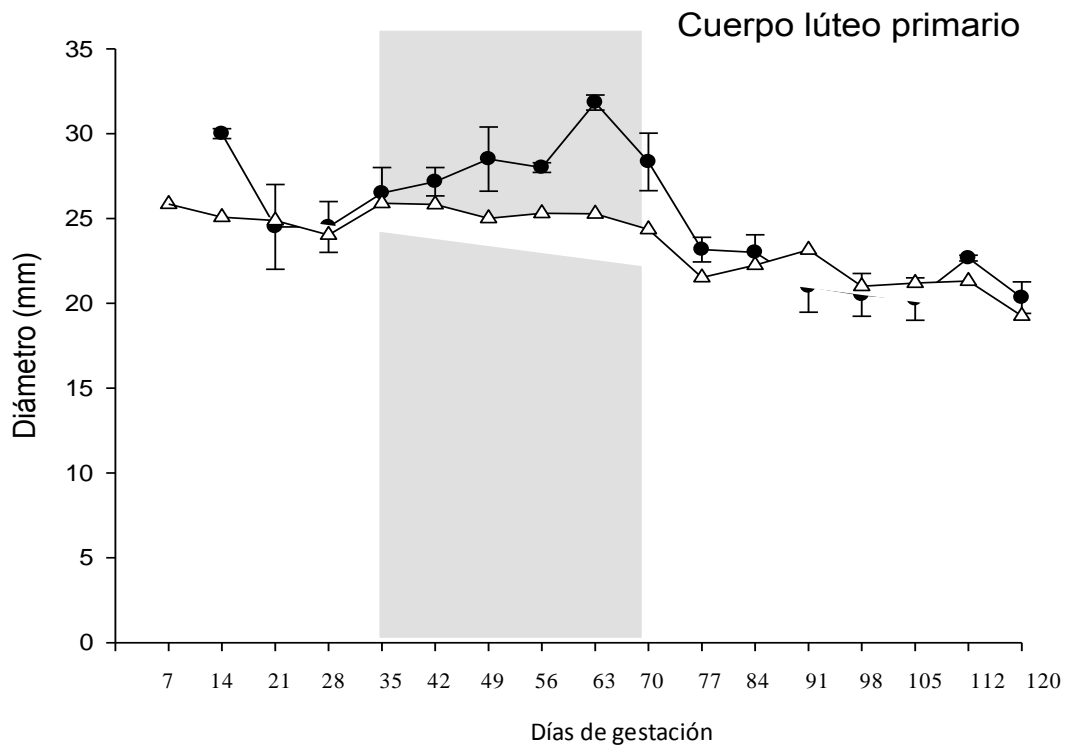
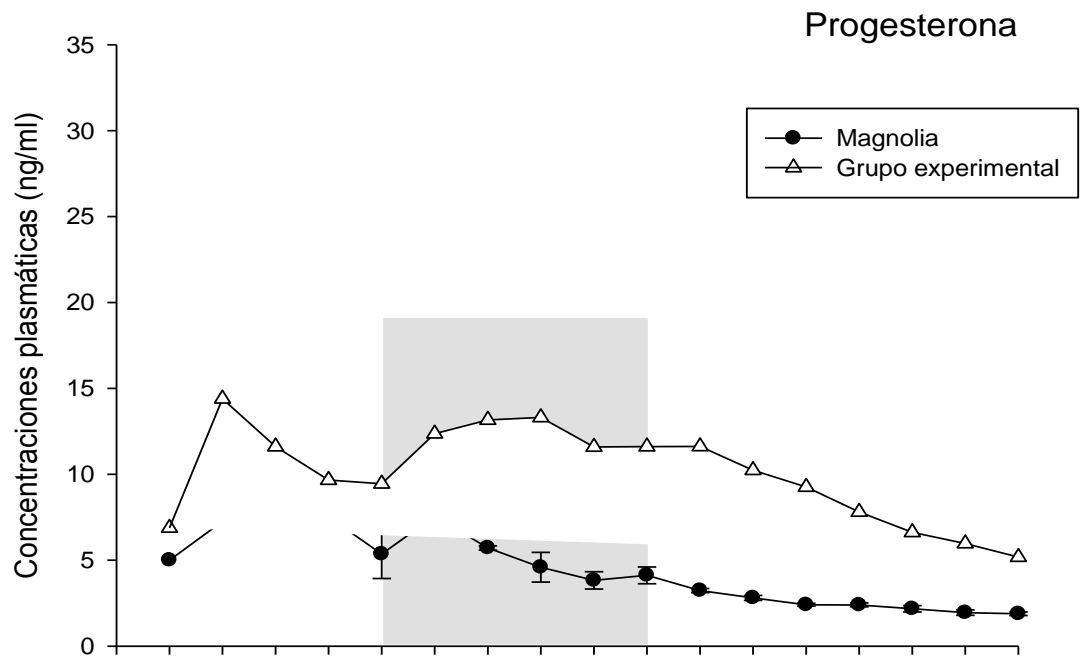


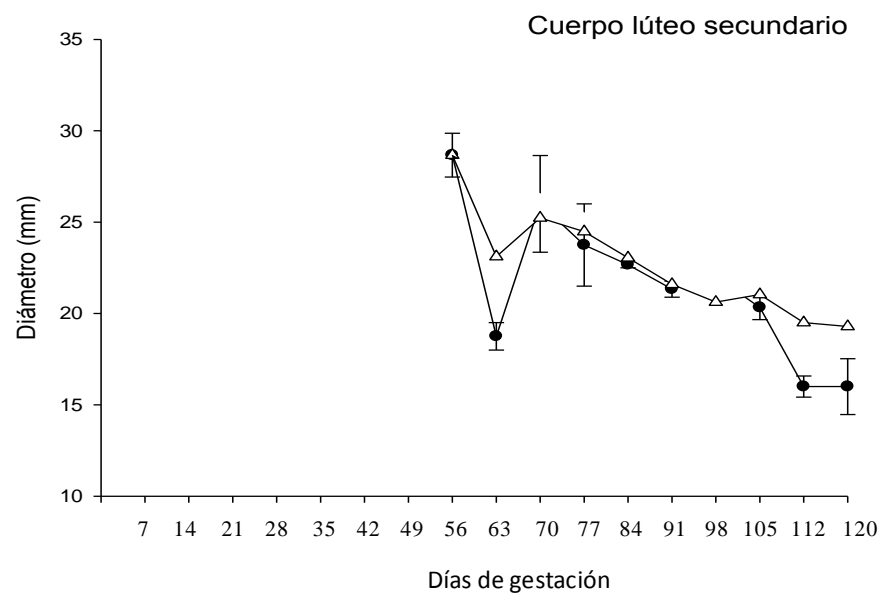
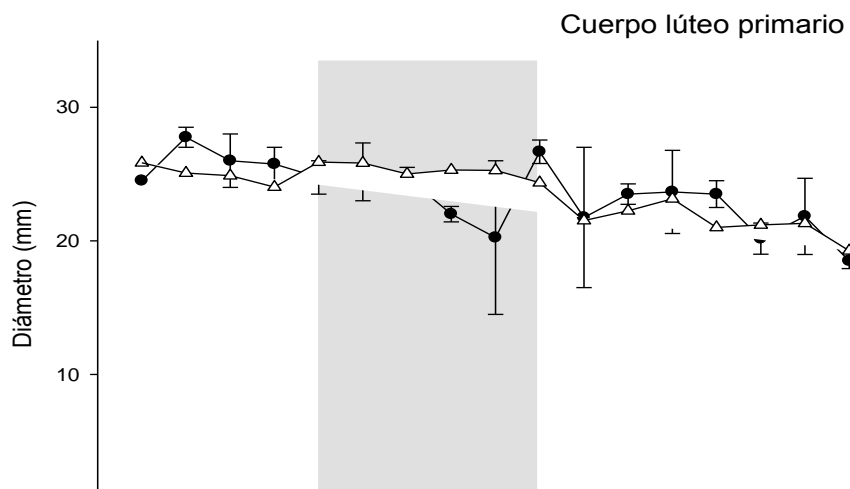
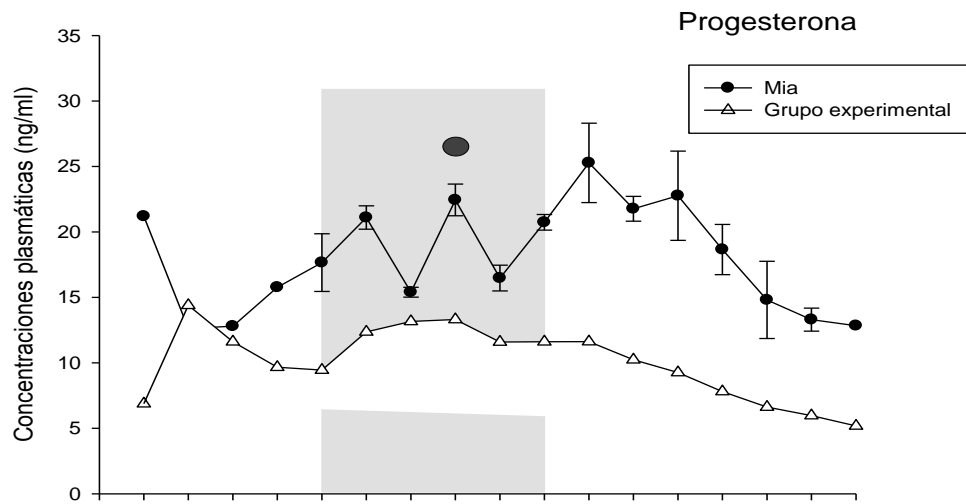


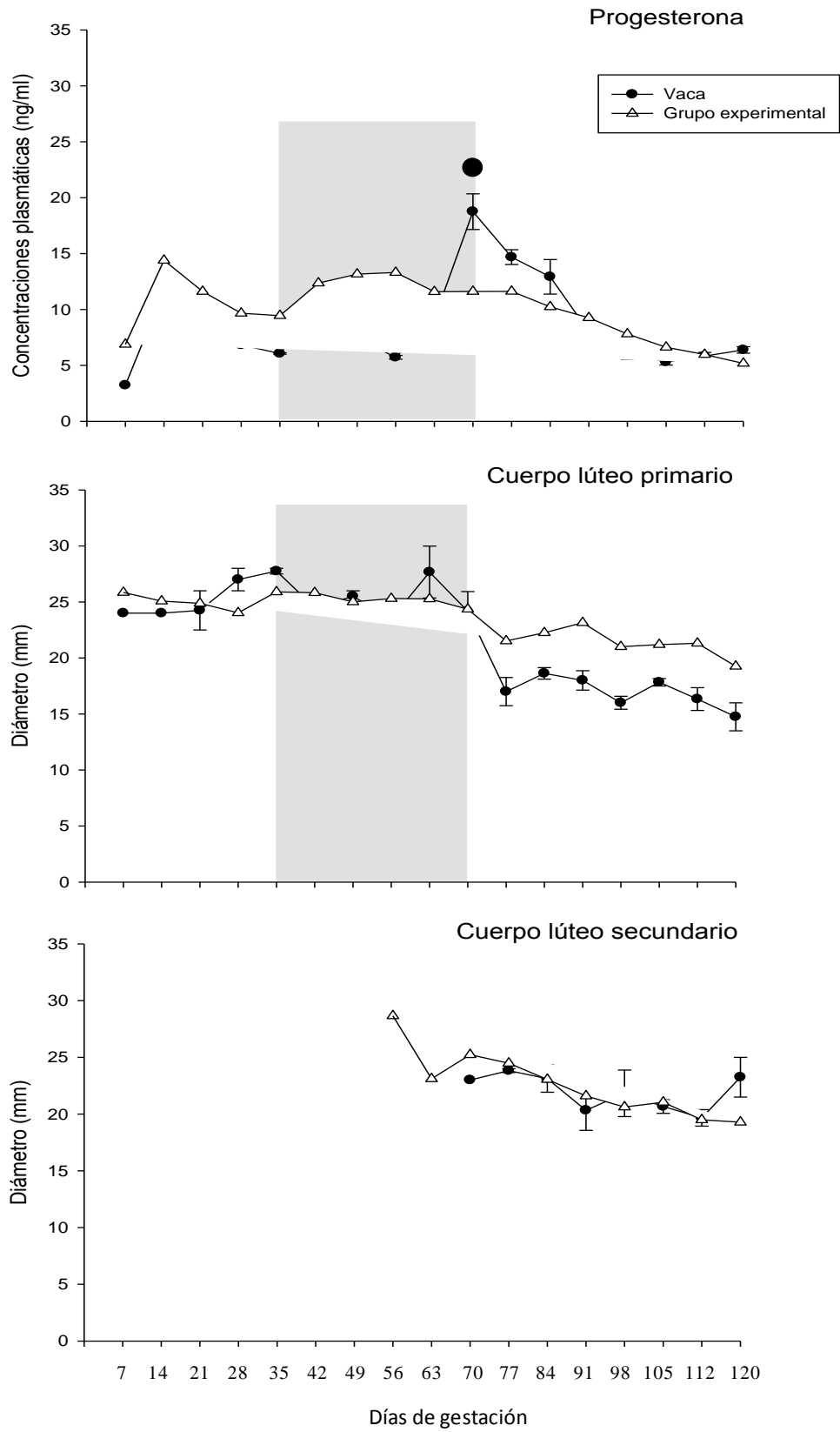




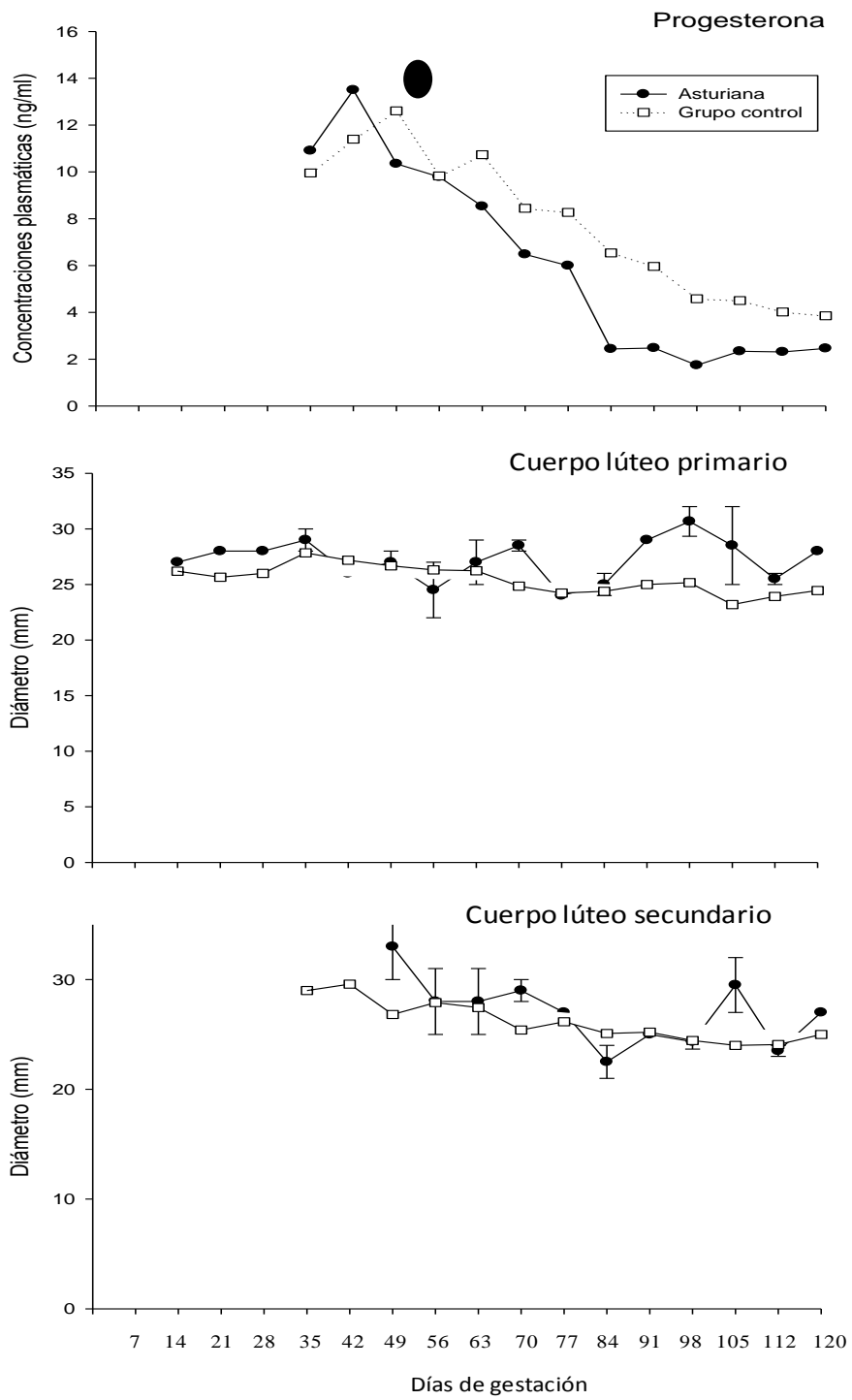


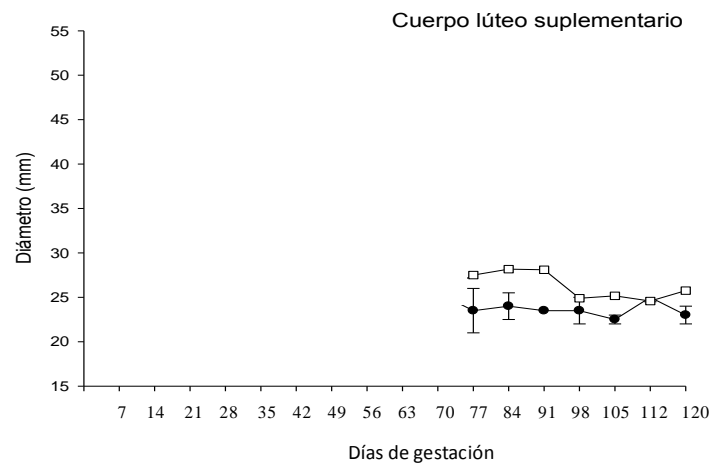
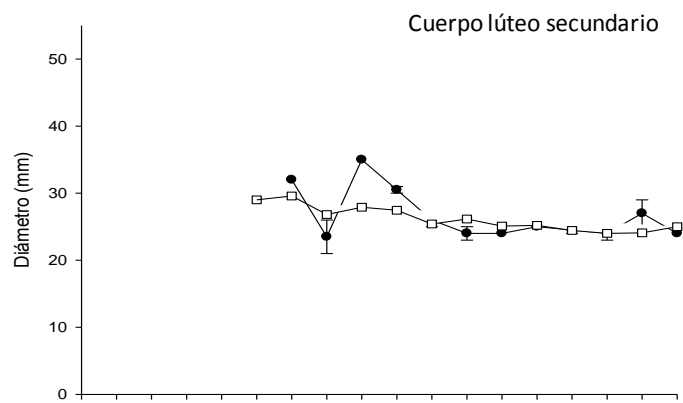
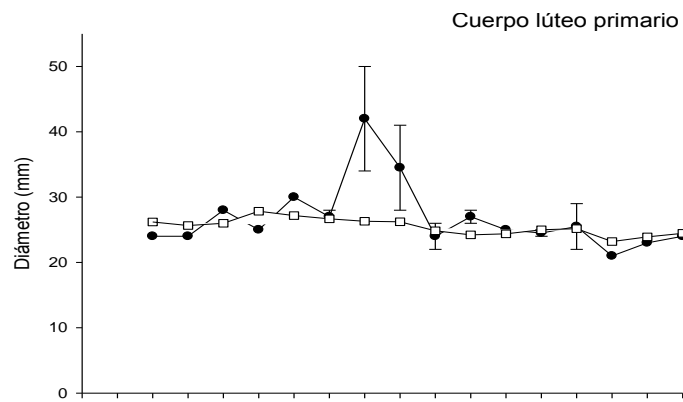
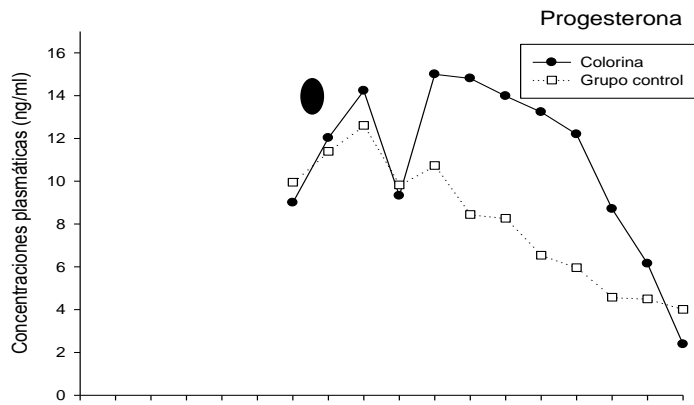




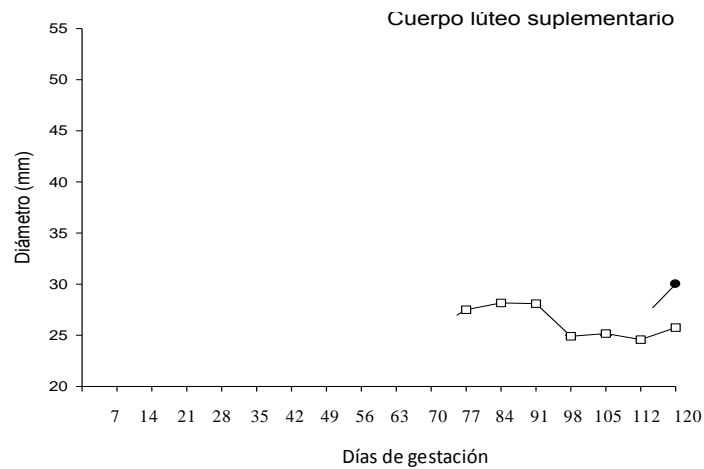
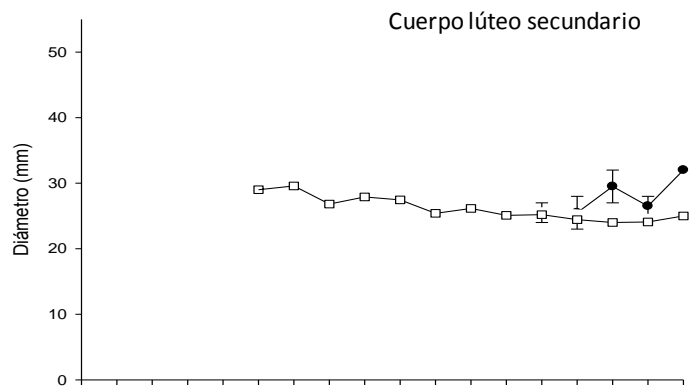
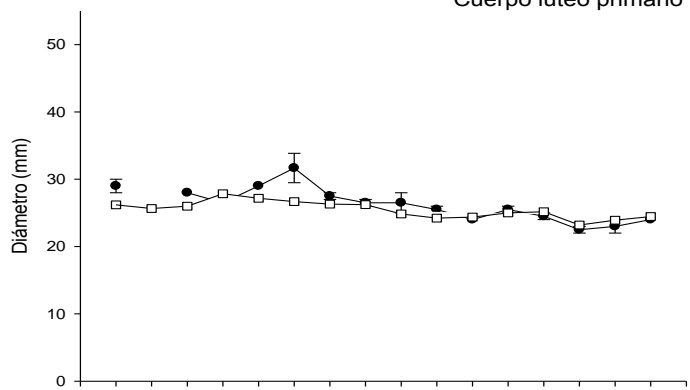
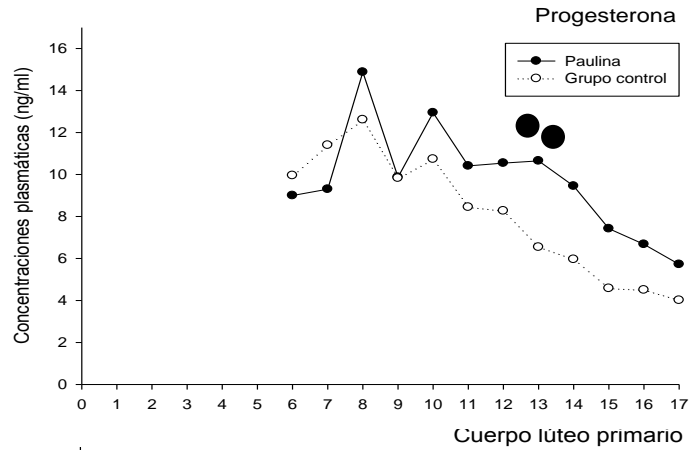


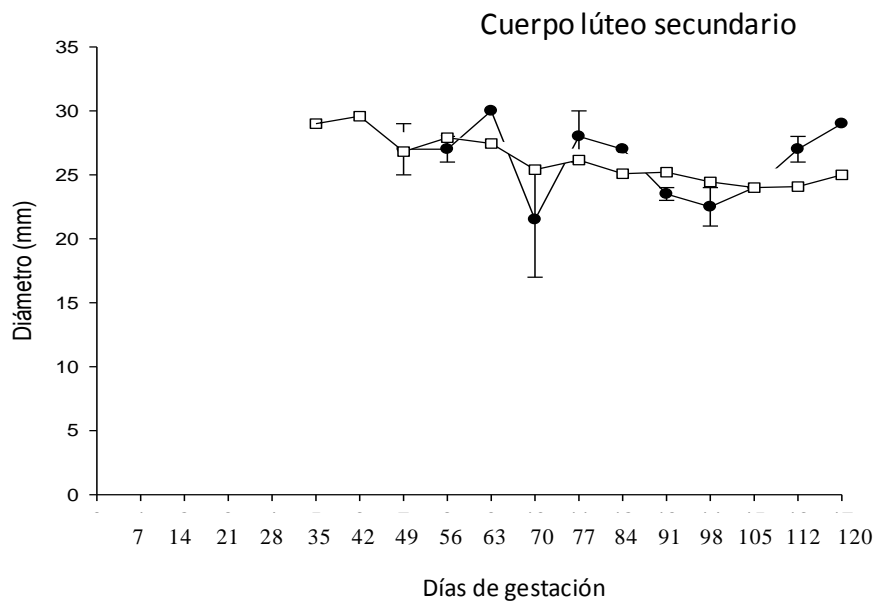
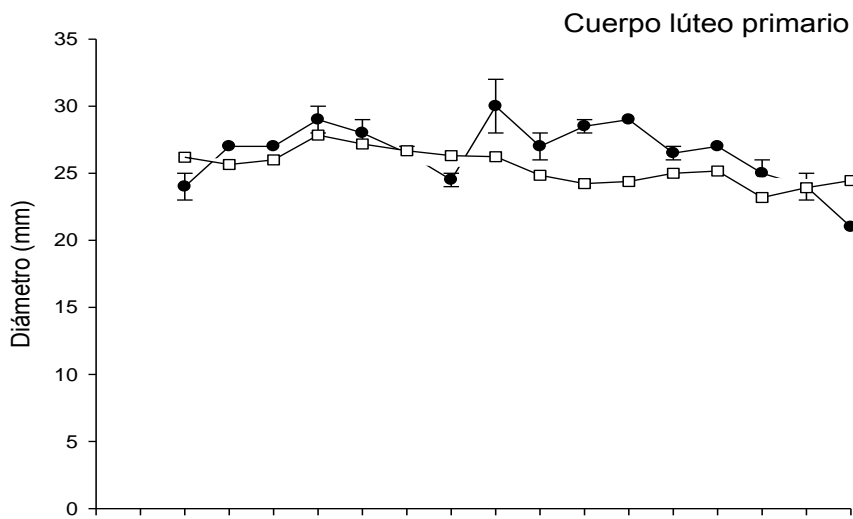
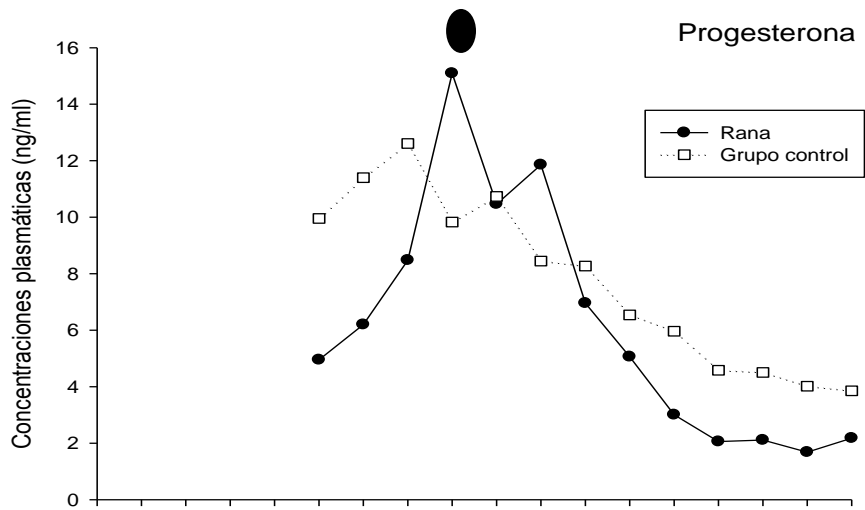
### 9.4 Yeguas grupo testigo

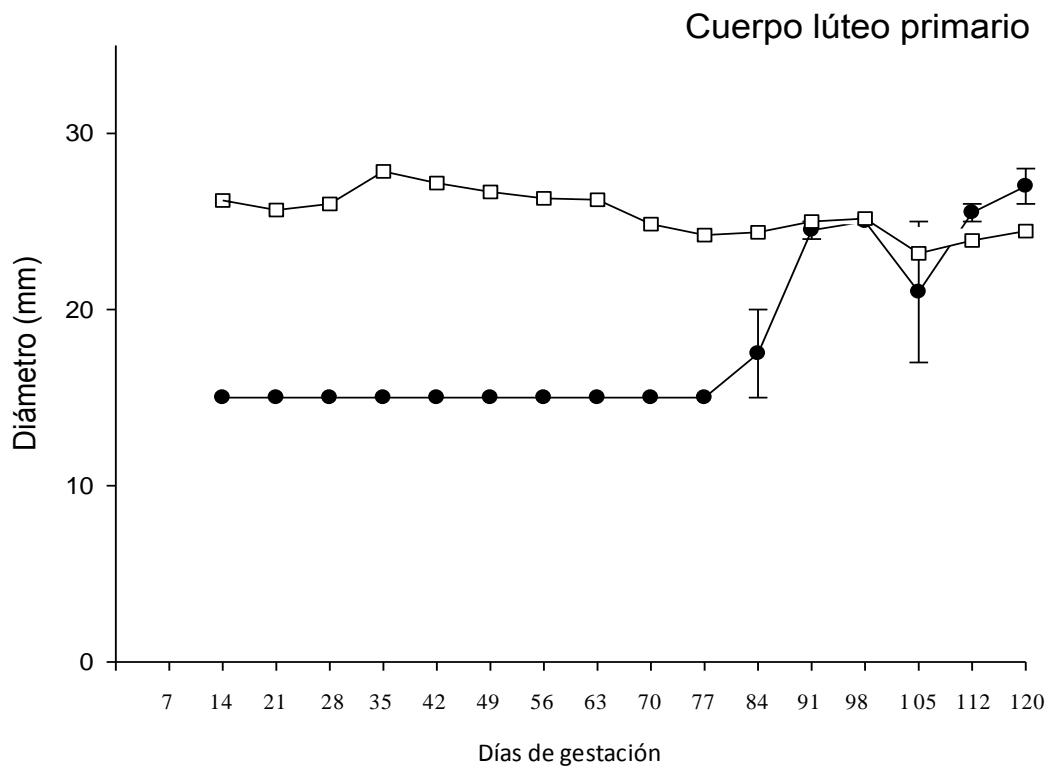
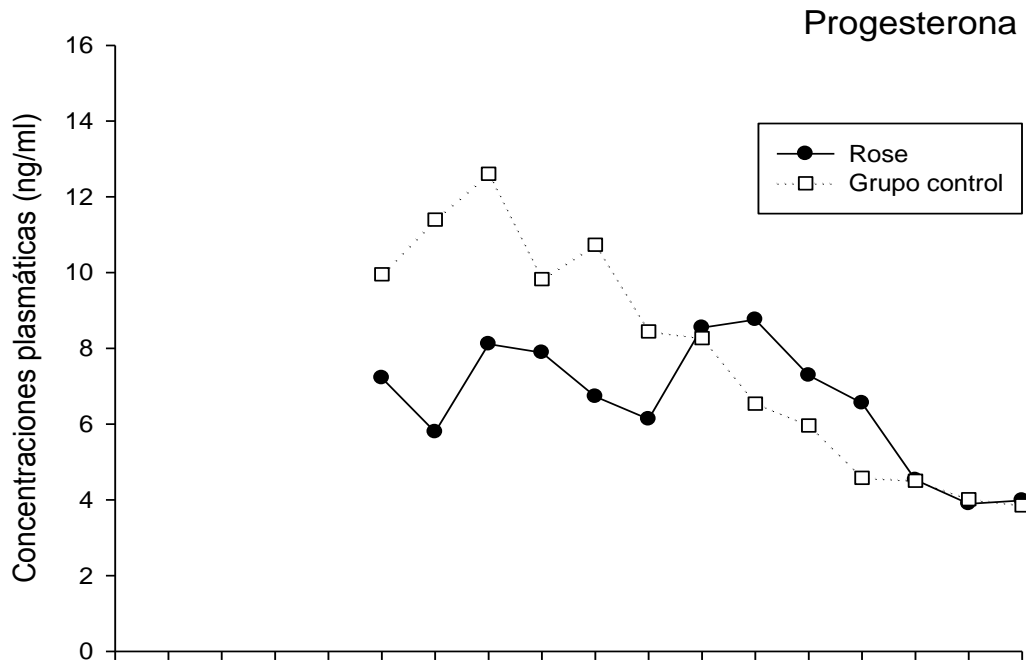


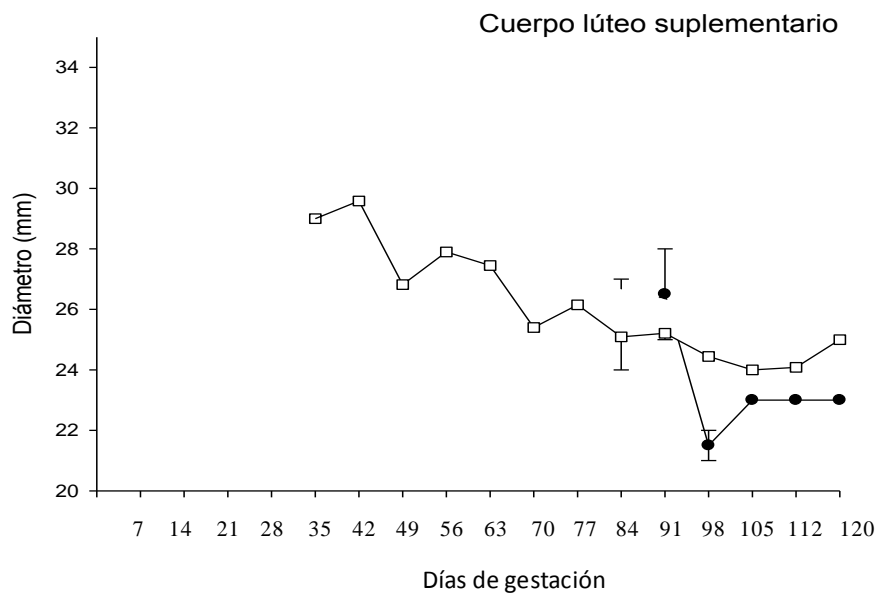
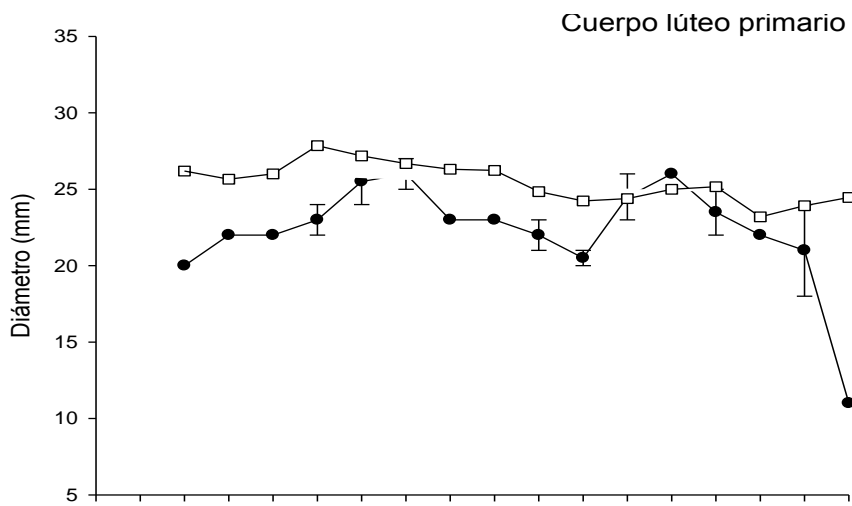
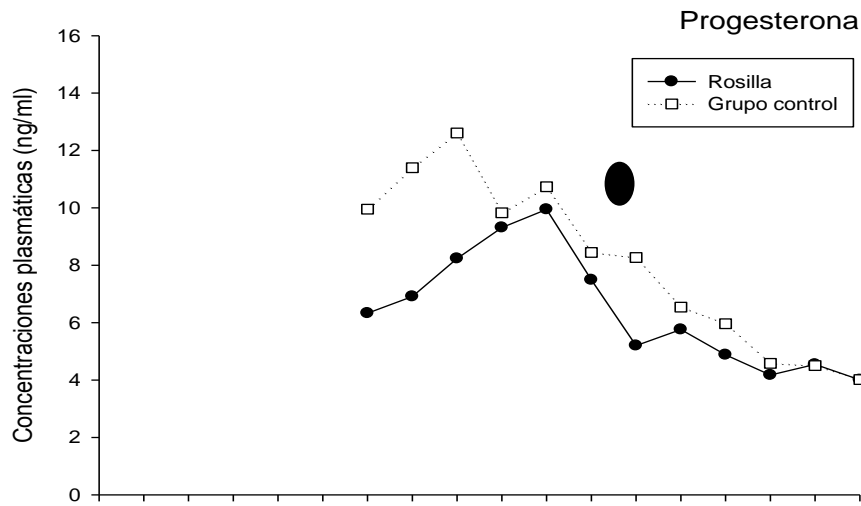


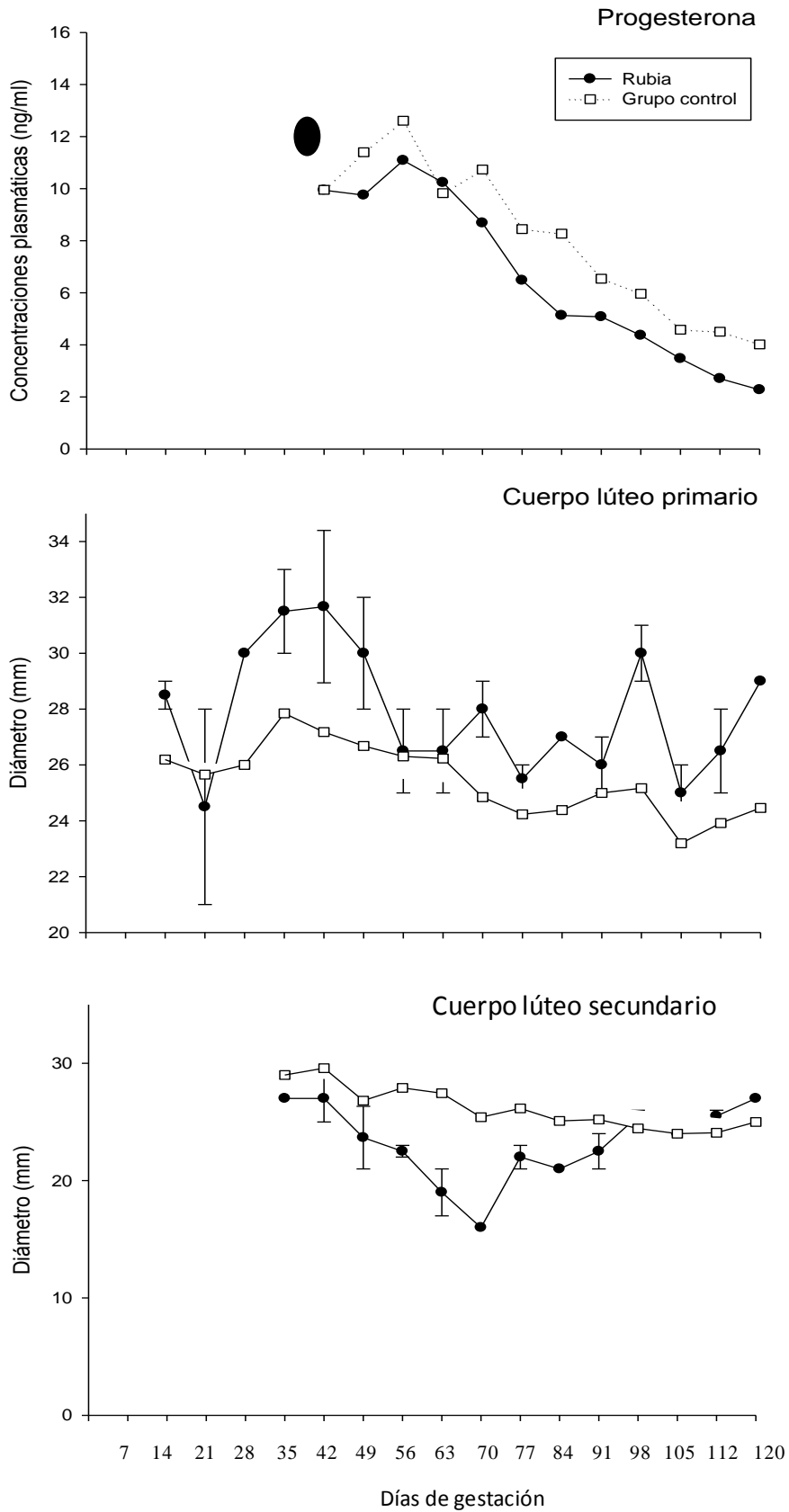


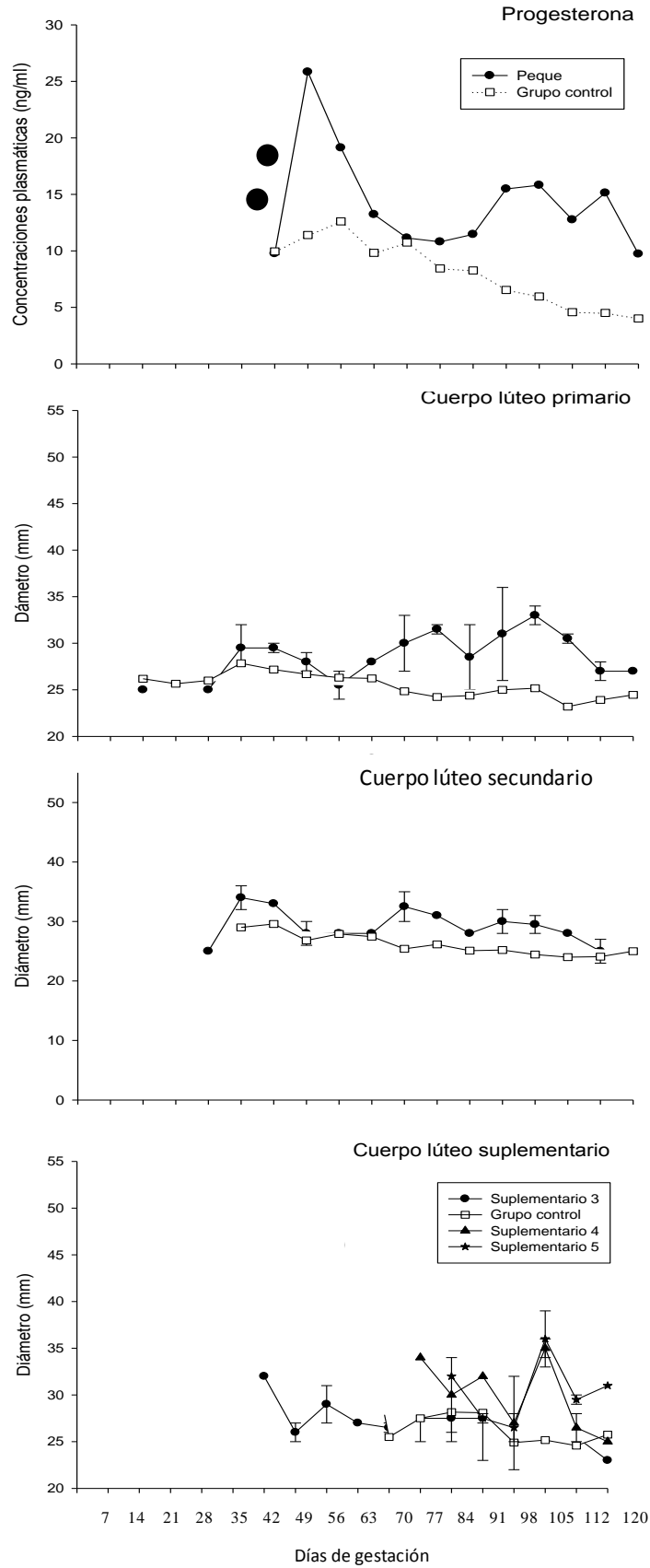


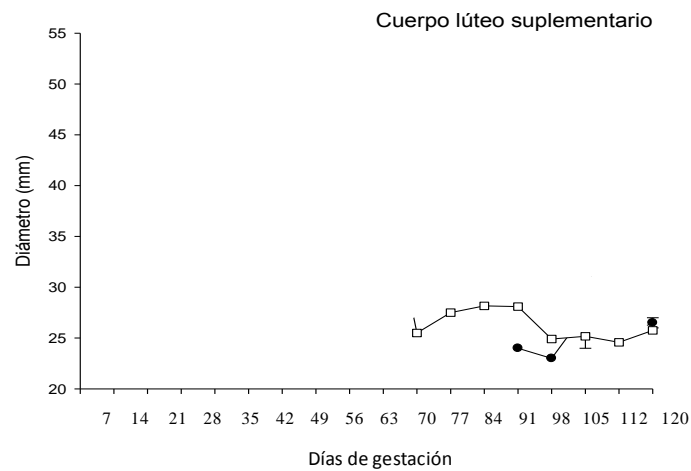
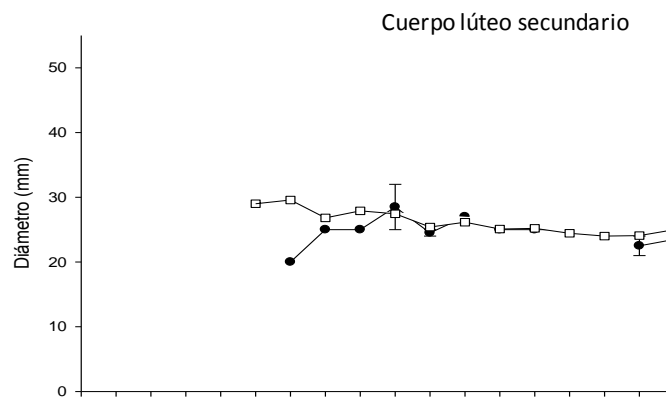
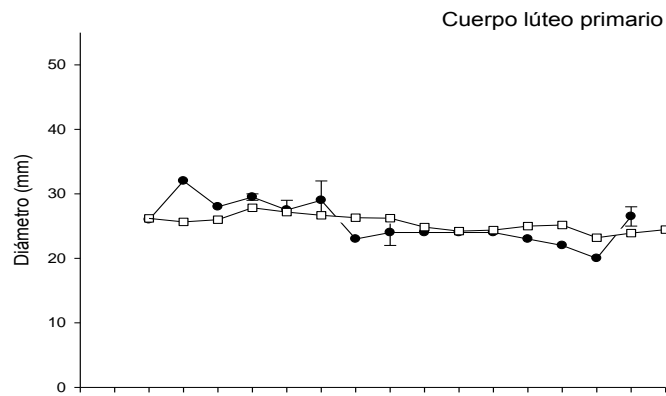
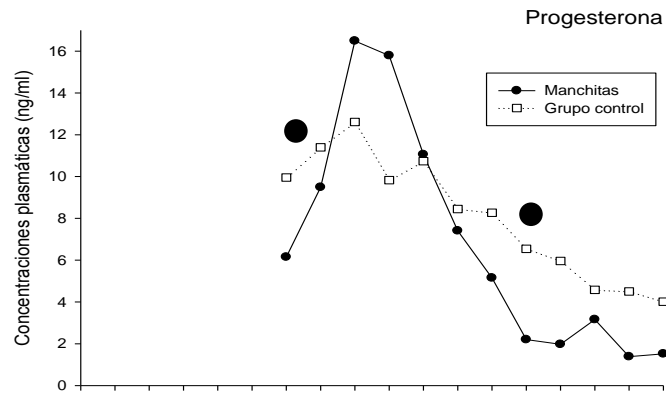


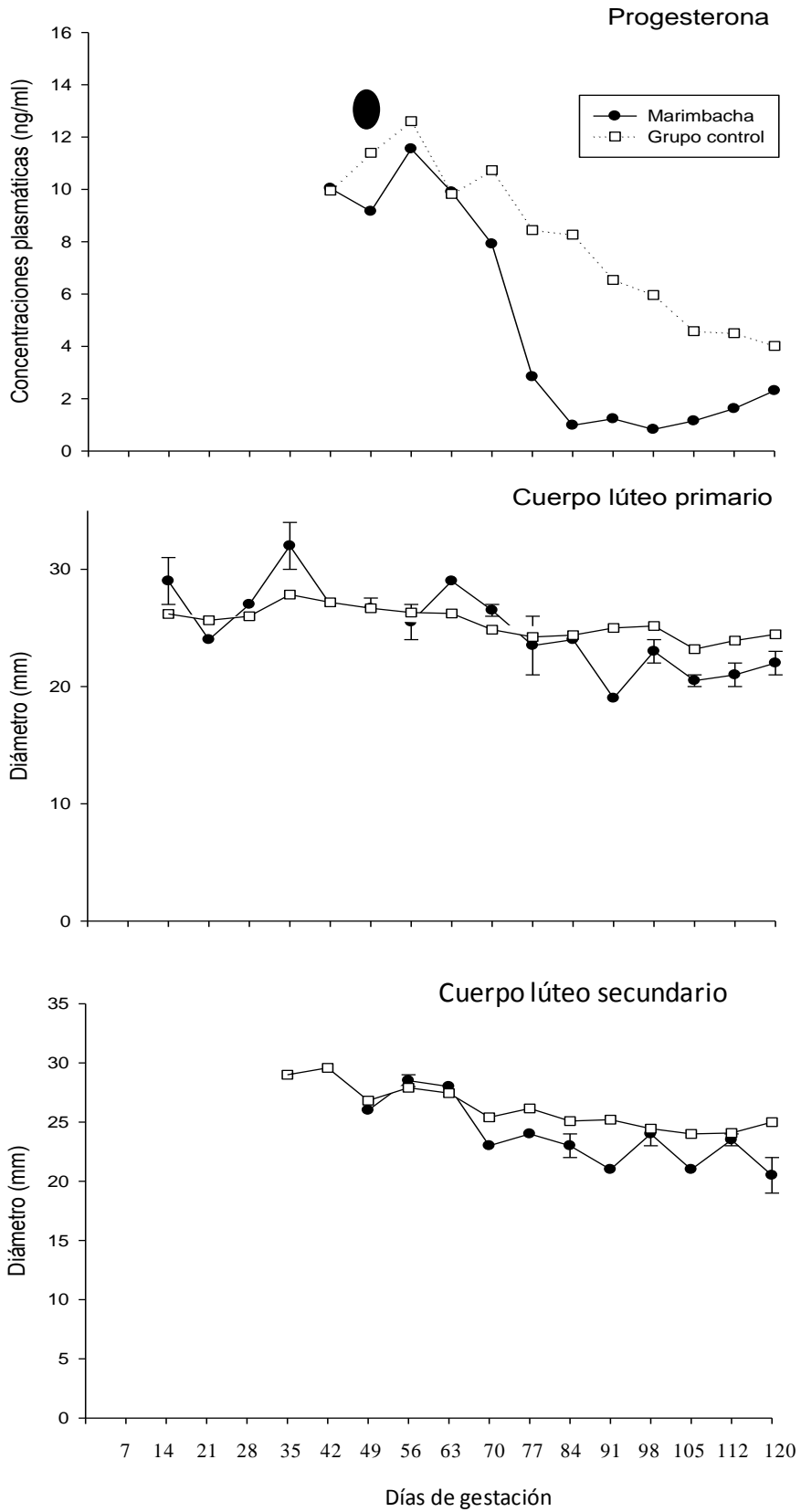




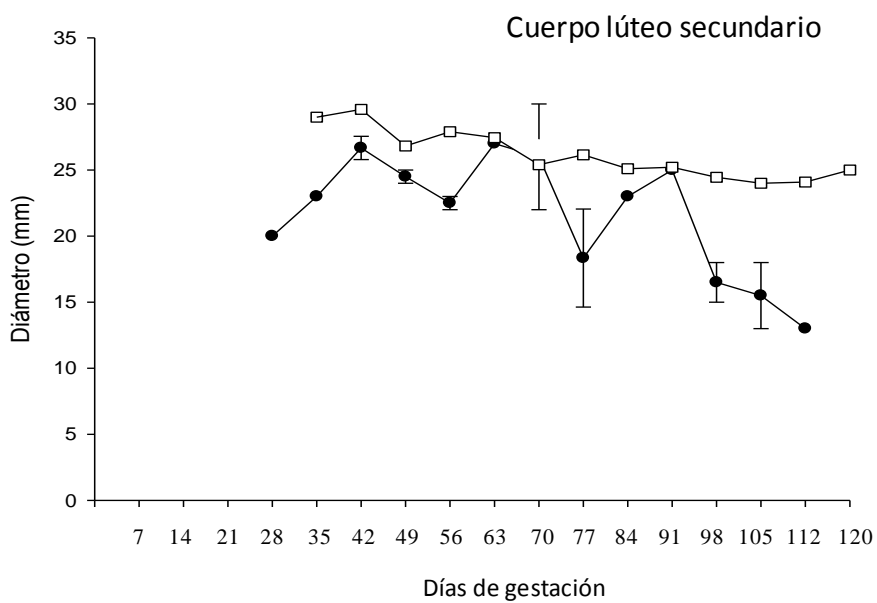
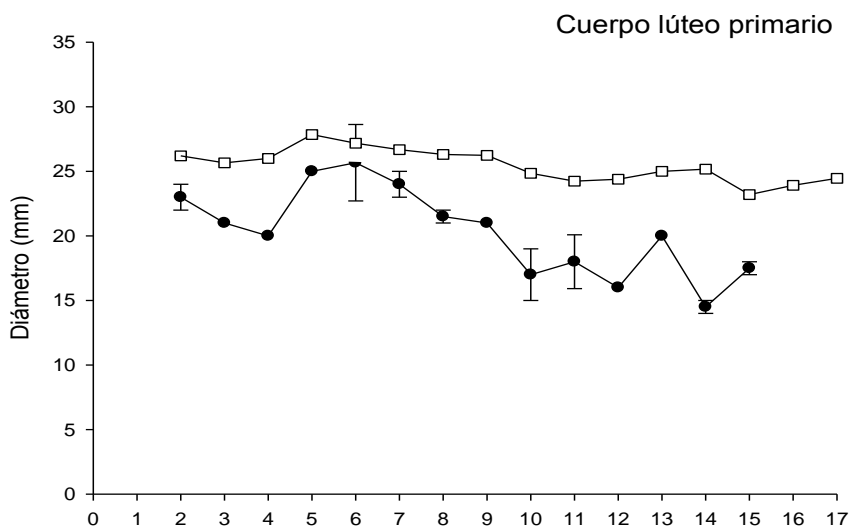
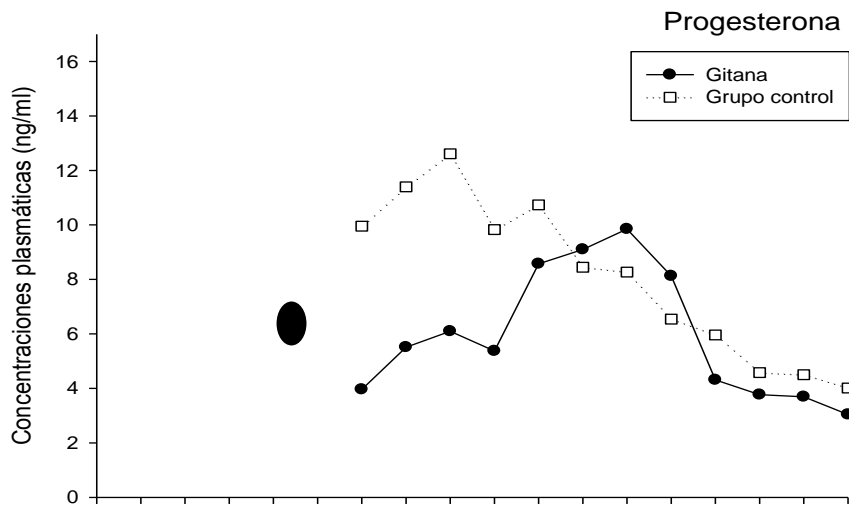


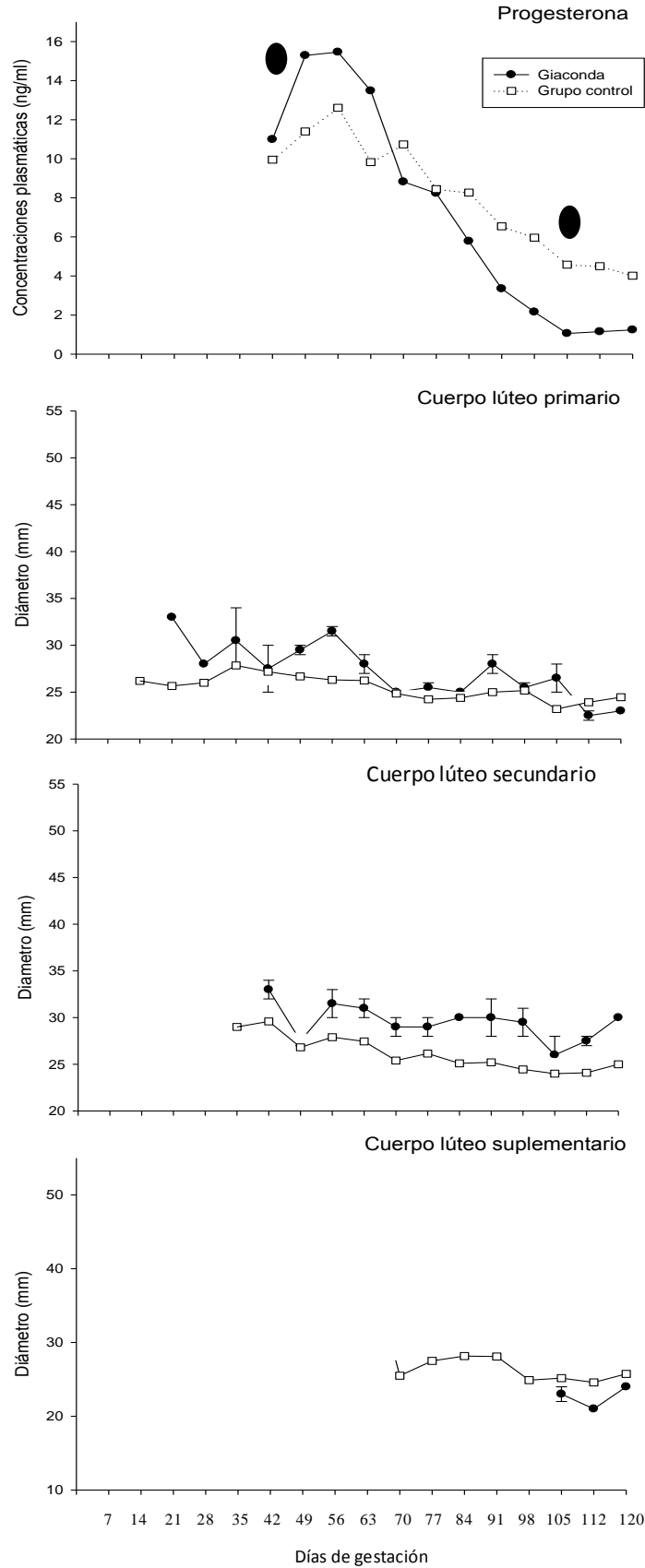


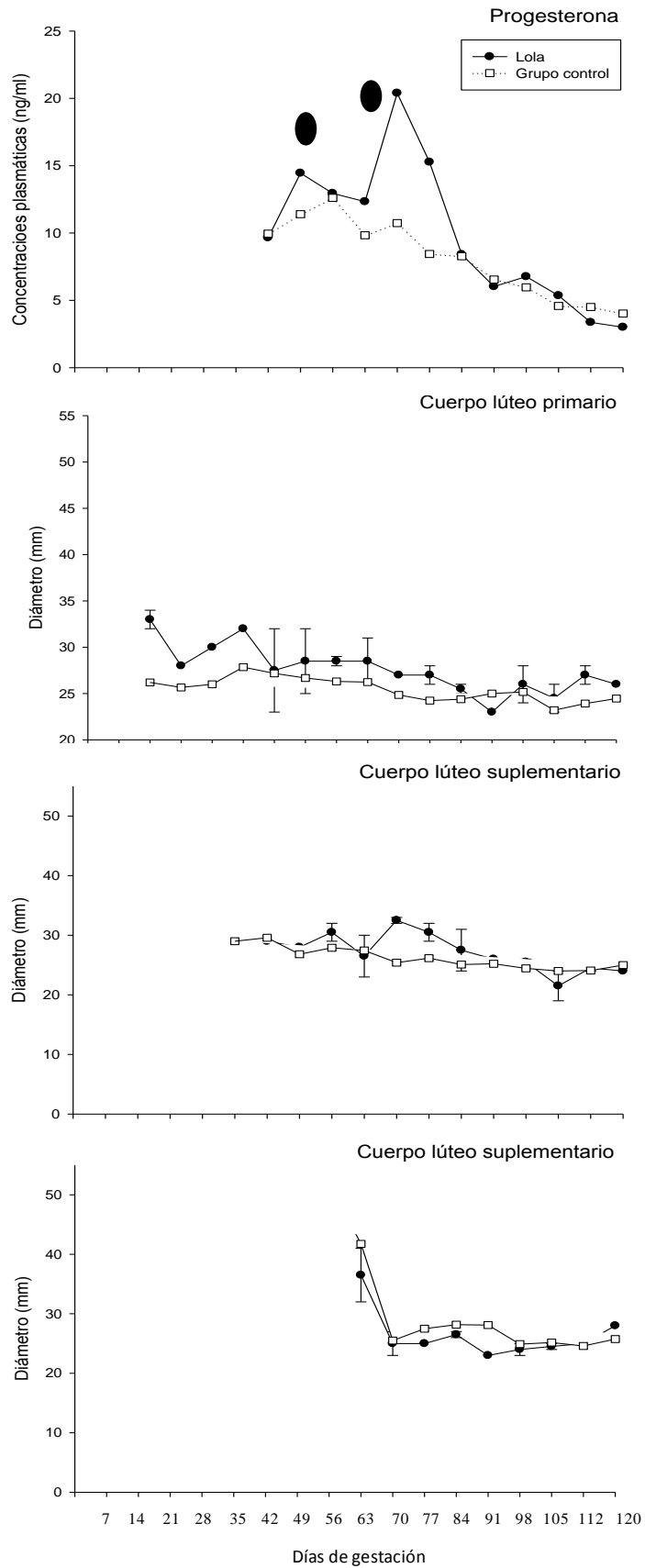












## 10. LITERATURA CITADA

Adams T.E., Horton M.B., Watson J.G., Adams B.M. Biological activity of luteinizing hormone (LH) during the estrous cycle of mares. *Domestic Animal Endocrinology*. 1986; Vol 3: 69-77.

Aguilar J., Fraser H.M., Wilson H., Clutton E., Shaw D.J. and Watson E.D. Temporal relationship between proliferating and apoptotic hormone-producing and endothelial cells in the equine corpus luteum. *Reproduction* . 2006; 132: 111-118.

Alamo R.M.M., Reilas T., Kindahl H., Katila T. Mechanisms behind intrauterine device-induced luteal persistence in mares. *Animal Reproduction Science*. 2008; 107: 94-106.

Alexander S.L., Irvine C.H.G. GnRH secretion in the mare. *Animal Reproduction Science*. 1996; 42: 173-180.

Allen W.R. and Moor R.M. The origin of the equine endometrial cups. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1972; 29 : 313-316.

Allen W.R., Hamilton D.W. and Moor R.M. The origin of the equine endometrial cups. II. Invasion of the endometrium by trophoblast. *Anatomical Record*. 1973; 177: 485- 501.

Allen W.R. and Urwin V. Preliminary studies on the use of an oral progestagen to induce oestrus and ovulation in seasonally anoestrus Thoroughbred mares. *Equine Veterinary Journal*. 1980; 12: 141-145.

Allen W.R. Hormonal control of early pregnancy in the mare. *Animal Reproduction Science*. 1984; 7 : 283-304.

Allen W.R. and Short R.V. Interspecific and extraspecific pregnancies in equids: Anything goes. *The Journal of Heredity*. 1997; 88 : 384-392.

Allen W.R. The physiology of early pregnancy in the mare. 2000; *AAEP Proceedings*. 2000; Vol 46: 338- 355.

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

Allen WR, Kydd JH, Boyle MS, Antczak DF. Extraspecific donkey-in-horse pregnancy as a model of early fetal death. *J Reprod Fert Suppl* 1987; 35: 197-209.

Ball B.A., Miller P.G., Daels P.F. Influence of exogenous progesterone on early embryonic development in the mare. *Theriogenology*. 1992; 38: 1055-1063.

Bergfelt D.R., Pierson R.A. and Ginther O.J. Resurgence of the primary corpus luteum during pregnancy in the mare. *Animal Reproduction Science*. 1989; 21 : 261-270.

- Bergfelt D.R., Gastal E.L., Ginther O.J. Response of estradiol and inhibin to experimentally reduced luteinizing hormone during follicle deviation in mares. *Biology of Reproduction*. 2001; 65: 426-432.
- Bergfelt D.R., Pierson R.A., Ginther O.J. Regression and resurgence of the CL following PGF<sub>2α</sub> treatment 3 days alter ovulation in mares. *Theriogenology*. 2006; 65: 1605-1619.
- Bergfelt D.R., Adams G.P. Ovulation and corpus luteum development. In Samper, J.C. *Current-therapy in equine reproduction*. Saunders Company, Elsevier, St. Louis Missouri. 2007; pp. 1-13.
- Boeta M. y Zarco L. Utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas. *Veterinaria Mexico*. 2000; (31): 67-69
- Boeta M. Efecto de la época del año sobre la funcionalidad de las copas endometriales y la secreción de eCG en yeguas utilizadas para la producción de mulas. Tesis para obtener el grado de doctora en ciencias de la producción y de la salud animal. U.N.A.M. 2008.
- Boeta, M., Zarco L., Progesterone and equine chorionic gonadotropin concentrations around the time of pregnancy loss in mares impregnated by donkeys or stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2005; (25): 531-538 (2005).
- Boeta, M., Zarco, L., Endocrine alterations around the time of abortion in mares impregnated with donkey or horse semen. *Anim Reprod Sci* 2010; 121(1): 124-130 (2010).
- Bollwein H., Mayer R., Weber F., Stolla R. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*. 2002; 65: 2043-2051.
- Brown K.A., Bouchard N., Lussier J.G., Sirois J. Down-regulation of messenger ribonucleic acid encoding an importer of sulfoconjugated steroids during human chorionic gonadotropin-induced follicular luteinization in vivo. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2007; 103: 10-19.
- Carluccio A., Panzani S., Contri A., Tosi U., Amicis I., Veronesi M.C. Luteal function in jennies following PGF<sub>2α</sub> treatment 3 days alter ovulation. *Theriogenology*. 2008; 03. 010.
- Charnok-Jones D.S, Smith S.K. Vascular endotelial growth factor and corpus luteum angiogenesis. *Angiogenesis*. 1998; 2 : 119-121.
- Cox T.J., Squires E.L., Carnevale E.M. Effect of follicle size and follicle-stimulating hormone on ovulation induction and embryo recovery in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2009; 29: 213-218.

Daels P.F., Chang G.C., Hansen B. and Mohammed H.O. Testosterone secretion during early pregnancy in mares. *Theriogenology*. 1996; 45: 1211-1219.

Daels P.F., Albrecht B.A. and Mohammed H.O. Equine chorionic gonadotropin regulates luteal steroidogenesis in pregnant mares. *Biology of Reproduction*. 1998; 59: 1062-1068.

Denniston D.J., Crabb J.J., Bruemmer J.E., Squires E.L. Effects of a gonadotropin-releasing hormone antagonist and altrenogest on luteinizing hormone concentration and ovulation in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2006; Vol 26 No 3: 95-101.

Diaz Chico B.N. Bioquímica básica de las hormonas esteroideas: Biología y clínica del cancer. *Biocancer*. 2004; 2: 1-22.

Ealy A.D., Eroh M.L., Sharp D.C. Prostaglandin H synthase type 2 is differentially expressed in endometrium based on pregnancy status in pony mares and responds to oxytocin and conceptus secretions in explant culture. *Animal Reproduction Science*. 2009, doi : 10.1016/j.anireprosc. 2009.03.014. 7 pages.

Enders A.C., Meadows S., Stewart F., Allen W.R. Failure of endometrial cup development in the donkey in horse model of equine abortion. *Journal of Anatomy*. 1996; 188: 575-589.

Gastal E.L., Gastal M.O., Nogueira G.P., Bergflet D.R. and Ginther O.J. Temporal interrelationships among luteolysis, FSH and LH concentrations and follicle deviation in mares. *Theriogenology*. 2000; 53: 925-940.

Gastal E.L., Gastal M.O., Donadeu F.X., Acosta T.J., Beg M.A., Ginther O.J. Temporal relationships, and follicle vascularization preceding the first compared with later ovulations during the year in mares. *Animal Reproduction Science*. 2007; 102: 314-321.

Geisert, R. D., Short, E.C. Short and Zavy, M.T. Maternal recognition of pregnancy. *Animal Reproduction Science*. 1992; 28:287-298.

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

Ginther O.J. *Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects*, 2nd. ed. Cross Plain: Equiservicies. 1992.:419-456

Ginther O.J. Equine pregnancy: physical interactions between the uterus and conceptus. *AAEP Proceedings*. 1998; Vol 44: 73-105.

Ginther O.J., Utt M.D., Bergfelt D.R., Beg M.A. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. *Animal Reproduction Science*. 2006; 95:144-150.

Ginther O.J., Gastal E.L., Gastal M.O., Utt M.D., Beg M.A. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Animal Reproduction Science*. 2007; 99: 213-220.

Ginther O.J., Gastal E.L., Gastal M.O., Beg M.A. Intrafollicular effect of IGF1 on development of follicle dominance in mares. *Animal Reproduction Science*. 2008; 105: 417-423.

Greaves H.E., Kalariotes V., Cleaver B.D., Porter M.B. and Sharp D.C. Effects of ovarian input on GnRH and LH secretion immediately postovulation in pony mares. *Theriogenology*. 2001; 55:1095-1106.

Guyton A.C., Hall J.E. *Tratado de Fisiología Médica*. Novena edición. New York; México: Interamericana Mc Graw-Hill, 1997; 1133-1148.

Handler J., Wustenhagen A., Schams D., Kindahl Hans., Aurich C. Estrous Cycle characteristics, luteal function, secretion of oxytocin (OT) and plasma concentrations of 15-keto-13,14-dihydro-PGF $2\alpha$  (PGF $\alpha$ -metabolite) alter administration of low doses of prostaglandin F $2\alpha$  (PGF $2\alpha$ ) in pony mares. *Theriogenology*. 2004; 61 : 1573-1582.

Hinrichs K., Sertich P.L., Kenney R.M. Use of altrenogest to prepare ovariectomized mares as embryo transfer recipients. *Theriogenology*. 1986; Vol 26 No 4: 455-460.

Hodgson D., Howe S., Jeffcott L., Reid S., Mellor D., Higgins A. Effect of prolonged use of altrenogest on behaviour in mares. *The Veterinary Journal*. 2005; 169: 113-116.

Holtan D.W., Nett T.M. and Estergreen V.L. Plasma progestins in pregnant, postpartum and cycling mares. *Journal of Animal Science*. 1975; 40 : 251-260.

Jackson S.A., Squires E.L. and Nett T.M. The effect of exogenous progestins on endogenous progesterone secretion in mares. *Theriogenology*. 1986; Vol 25 No 2: 275-279.

James A.N., Vogelsang M.M., Forrest D.W., Stott G.G. Efficacy of short-term administration of altrenogest to postpone ovulation in mares. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1998; Vol 18 No 5: 329-331.

Jasko D.J., Farlin M.E., Hutchinson H., Moran D.M., Squires E.L. and Burns P.J. Progesterone and estradiol in biodegradable microspheres for control of estrus and ovulation in mares. *Theriogenology*. 1993; 40: 465-478.

Kastelic J.P., Adams G.P. and Ginther O.J. Role of progesterone in mobility, fixation, orientation and survival of the equine embryonic vesicle. *Theriogenology*. 1987; Vol 27 No 4: 655-663.

Knobil E, Neil J.D. *Encyclopedia of Reproduction*. Equine Chorionic Gonadotropin. Academic Press. 1998; 2: 29-36

Knowles J.E., Squires E.L., Shideler R.K., Tarr S.F., Nett T.M. Progestins in mid-to late-pregnant mares. *Journal of Equine Veterinary*. 1994; Vol 14 No 12: 659-663.

Konyukhov B.V. and Platonov E.S. Genomic imprinting in mammals. *Russian Journal of genetics*. 2001; Vol 37 No 1: 1-12.

Lee M.S. Efficacy of oral altrenogest for postponing ovulation in the mare. Thesis Master of Science. Texas A&M University. 2003. pp 49-50.

Luliano M.F., Squires E.L. Effect of exogenous progesterone on pregnancy rates after surgical embryo transfer in mares. *Theriogenology*. 1986; Vol 26 No 3: 291-298.

Martin-Roset, W. La alimentación de los caballos, Barcelona (España). Aedos. 1993:229.

Martin J.L., Saltiel., Evans J.W. Progesterone synthesis by different types of corpora lutea during the first 198 days of pregnancy. *Equine Veterinary Science*. 1989; Vol 9 No 2: 84-87.

McCue P.M., Nickerson C.K., Squires E.L., Farquhar V.J., Nett T.M. Effect of altrenogest on luteinizing hormone concentrations in mares during the transition period. *AAEP/Proceedings*. 2001; Vol 47: 249-251.

McKinnon A.O., Squires E.L., Carnevale and Hermetet M.J. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipient and as model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. *Theriogenology*. 1988; Vol 29 No 5: 1055-1063.

Miller K.F., Berg S.L., Sharp D.C. and Ginther O.J. Concentrations of circulating gonadotropins during various reproductive states in mares. *Biology of Reproduction*. 1980; 22: 744-750.

Murphy B.D., Martinuk S.D. Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Reviews*. 1991; 12: 27-44.

Nagy P., Huszenicza Gy., Reiczigel J., Juhász J., Kulcsár M., Abaváry K., Guillaume D. Factors affecting plasma progesterone concentration and the retrospective determination of time of ovulation in cyclic mares. *Theriogenology*. 2004; 61 : 203-214.

Nambo Y., Nagaoka K., Tanaka Y., Nagamine N., Shinbo H., Nagata S., Yoshihara T., Watanabe G., Groome N.P., Taya K. Mechanisms responsible for increase in circulating inhibin levels at the time of ovulation in mares. *Theriogenology*. 2002; 57: 1707-1717.

Nie G.J. Estrous suppression. In Samper, J.C. *Current Therapy in Equine Reproduction*. Saunders Company, Elsevier, St. Louis Missouri. 2007; pp.26-31.

Newcombe J. R. The incidence of fluid in the post ovulatory area and in the early corpus luteum in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1997; 17: 58- 63.



Niswender G.D., Juengel J.L., Silva P.J., Rollynson M.K. and McIntush E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*. 2000; 80: 1-29.

Ousey J.C., Houghton E.D., Grainger L., Rosedale P.D., Fowden A.L. Progestagen profiles during the last trimester of gestation in Thoroughbred mares with normal or compromised pregnancies. *Theriogenology*. 2005; 63: 1844-1856.

Pierson R.A. and Ginther O.J. Ultrasonic evaluation of the corpus luteum of the mare. *Theriogenology*. 1985; Vol 23 No 5 : 795- 806.

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

Senger P.L. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Second Edition. Current Conceptions. 2003 : 183-214.

Sevinga M., Schukken Y.H., Hesselink J.W., Jonker F.H. Relationship between ultrasonic characteristics of the corpus luteum, plasma progesterone concentration and early pregnancy diagnosis in Friesian mares. *Theriogenology*. 1999; 52 : 585-592.

Sharp D.C., Zavy M.T., Vernon M.W., Bazer F.W., Thatcher W.W., Berlund L.A. The role of prostaglandins in the maternal recognition of pregnancy in mares. *Animal Reproduction Science*. 1984; 7: 269-282.

Shoemaker C.F., Squires E.L., Shideler R.K. Safety of altrenogest in pregnant mares and on health and development of offspring. *Equine Veterinary Science*. 1989; Vol 9 No 2: 69-72.

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

Squires E.L., Wentworth B.C. and Ginther O.J. Progesterone concentration in blood of mares during the estrous cycle, pregnancy and after hysterectomy. *Journal of Animal Science*. 1974a; 39: 759-767.

Squires E.L., Garcia M.C. and Ginther O.J. Effects of pregnancy and hysterectomy on the ovaries of pony mares. *Journal of Animal Science*. 1974b; 38: 823-830.

Squires E.L., Stevens W.B., McGlothlin D.E., Pickett B.W. Effect of an oral progestin on the estrous cycle and fertility of mares. *Journal of Animal Science*. 1979; Vol 49 No 3; 729-737.

Squires E.L., Heesemann C.P., Webel S.K., Shideler R.K. and Voss J.L. Relationship of altrenogest to ovarian activity, hormone concentrations and fertility of mares. *Journal of Animal Science*. 1983; 56: 901-910.

Squires E.L. Use progestins in open and pregnant mares. *Animal Reproduction Science*. 1993; 183-193.

Stewart F. and Allen W.R. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1981; 62: 527-536.

Stocco C., Telleria C. and Gibori G. The molecular control of corpus luteum formation, function and regression. *Endocrine Reviews*. 2007; 28: 117-149.

Thompson D.L., Reville S.I. and Derrick D.J. Short term mode of secretion of equine chorionic gonadotropin and the effect of GNRH. *Theriogenology*. 1982; Vol 18 No 5: 583-591.

Thway T.M., Clay C.M., Maher J.K., Reed D.K., McDowell K.J., Antczack D.F., Eckert R.L., Nilson J.H., Wolfe M.W. Immortalization of equine trophoblast cell lines of chorionic girdle cell lineage by simian virus-40 large T antigen. *Journal of Endocrinology*. 2001; 171: 45-55.

Townson D.H. and Ginther O.J. The development of fluid-filled luteal glands in mares. *Animal Reproduction Science*. 1988; 17 : 155-163.

Townson D.H. and Ginther O.J. Ultrasonic echogenicity of developing corpora lutea in pony mares. *Animal Reproduction Science*. 1989; 20: 143-153.

Townson D.H., Pierson R.A., Ginther O.J. Characterization of plasma progesterone concentrations for two distinct luteal morphologies. *Theriogenology*. 1989; Vol 32 No 2: 197-204.

Urias C. Papel de la gonadotropina coriónica equina en la estimulación de la esteroidogenesis durante la gestación equina. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias. U.N.A.M. 2008; 52-61.

Utt M.D., Acosta T.J., Wiltbank M.C., Ginther O.J. Acute effects of prostaglandin F<sub>2α</sub> on systemic oxytocin and progesterone concentrations during the mid-or late-luteal phase in mares. *Animal Reproduction Science*. 2007; 97 : 63-73.

Vanderwall D.K., Woods G.L., Weber J.A., Lichtenwalner A.B. Corpus luteal function in nonpregnant mares following intrauterine administration of prostaglandin E2 or estradiol-12 B. *Theriogenology*. 1994; 42: 1069-1083.

Vanderwall D.K., Newcombe J.R. Early embryonic loss. In Samper, J.C. *Current-Therapy in Equine Reproduction*. Saunders Company, El sevier, St. Louis Missouri. 2007; pp. 374-383.

Voller B.E., Parry-Weeks L. And Holtan D.W. The effect of regu-mate, a synthetic progestin, on early pregnancy maintenance, conceptus growth, and corpora lutea development in pregnant pony mares. *Equine Veterinay Science*. 1991; Vol 11 No 1: 46-50.

Watson E.D. Do mares possess an intracellular endometrial inhibitor of prostaglandins síntesis during early pregnancy?. *Theriogenology*. 1991; Vol 36 No 1: 67- 71.

Watson E.D., Thomson S.R.M., Howie A.F. Detection of steroidogenic acute regulatory protein in equine ovaries. *Journal of Reproduction and Fertility*. 2000; 119: 187-192.

Watson E.D., Bae S.-E., Al-zi'abi, Hogg C.O., Armstrong D.G. Expresión of mRNA encoding insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) during induced and natural regression of equine corpora lutea. *Theriogenology*. 2005; 64: 1371-1380.

Webb R. Woad K.J., Armstrong D.G. Corpus luteum function: local control mechanisms. *Domestic Animal Endocrinology*. 2002; 23: 277-285.

Wiepz G.J., Squires E.L. and Chapman P.L. Effects of norgestomet, altrenogest, and/or estradiol on follicular and hormonal characteristics of late transitional mares. *Theriogenology*. 1988; Vol 30 No 1: 181-193.

Wiltbank M.C. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. *Journal of Animal Science*. 1994; 72: 1873-1883.