



**COLEGIO DE POSGRADUADOS**

---

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN**

**EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**GANADERÍA**

**INFLUENCIA DEL APORTE DE PROGESTERONA EXOGENA (CIDR) POST-  
INSEMINACIÓN SOBRE LA FERTILIDAD DE OVINOS DE LAS RAZAS CRUZA  
SUFFOLK-DORSET**

**FIDEL MIGUEL TORRES LEMUS**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**NOVIEMBRE 2013**

La presente tesis titulada: **Influencia Del Aporte De Progesterona Exógena (CIDR) Post-Inseminación Sobre La Fertilidad De Ovinos De Las Razas Cruza Suffolk-Dorset**, realizada por el alumno: **Fidel Miguel Torres Lemus**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

RECURSOS GENETICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERIA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: \_\_\_\_\_



DRA. MA. TERESA SANCHEZ-TORRES ESQUEDA

ASESOR: \_\_\_\_\_



DR. OCTAVIO MEJÍA VILLANUEVA

ASESOR: \_\_\_\_\_



DR. LORENZO OLIVARES REYNA

## RESUMEN GENERAL

El objetivo fue determinar la relación entre el aporte de progesterona exógena a través de un dispositivo intravaginal (CIDR) con la fertilidad, durante el proceso de reconocimiento materno y el mantenimiento de la gestación después de la inseminación artificial. Las ovejas fueron sincronizadas mediante el uso de un dispositivo intravaginal impregnado de un progestágeno natural (CIDR), por un periodo de 9 días. Dos días antes del retiro del dispositivo se aplicó 15 mg de prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , vía intramuscular. Las ovejas fueron distribuidas al azar en dos grupos, para constituir los siguientes tratamientos: 1) ovejas inseminadas sin progesterona ( $P_4$ ) adicional (IASP) y 2) ovejas inseminadas que recibieron progesterona exógena ( $P_4$ ) (IACP) a través de un dispositivo intravaginal CIDR, 24 h post inseminación artificial y que sería reemplazado posteriormente al diagnóstico de la gestación al día 25 con la finalidad de llevar dicho aporte hasta el día 35 post inseminación. Se obtuvieron muestras sanguíneas de la vena yugular para determinar concentraciones de  $P_4$  cada 48 h durante los primeros 35 días y cada 72 h del día 35 al 50. Se utilizó un diseño completamente al azar, los datos fueron analizados a través del paquete estadístico SAS. No se encontraron diferencias ( $P > 0,05$ ) para las variables inicio y duración del estro. Los niveles de  $P_4$  en sangre de las ovejas en el grupo IACP fueron mayores ( $P < 0,05$ ). Las gestaciones fueron monitoreadas por ultrasonido, los días 25, 35 y 50 para dar seguimiento a la presencia de los embriones en ambos grupos. La ultrasonografía al día 25, mostró que no hubo diferencias en porcentaje de gestación en ambos grupos, sin embargo, para el día 35, el porcentaje de ovejas gestantes se redujo en el grupo IASP ( $P < 0,05$ ) comparado con el grupo IACP. La adición de  $P_4$  mediante los CIDR por un periodo de 35 días, mostró que puede mantener porcentajes de gestación, lo cual no sucede en las hembras sin  $P_4$  adicional.

**Palabras clave:** Gestación, embrión, mortalidad

## ABSTRACT

The present research was conducted to determine whether additional use of exogenous progesterone ( $P_4$ ) post-Artificial Insemination (A.I.) using an intravaginal device (CIDR) improve pregnancy rate during the early gestation in yearling ewes. Fourty Dorset and Suffolk ewes were synchronized using an intravaginal device (CIDR) for a 9d period. The females were randomly assigned into two groups: Treatment IASP (n = 20) ewes were inseminated without additional  $P_4$ , and Treatment IACP (n = 20) in which ewes were inseminated and received exogenous  $P_4$  administered with an intravaginal device (CIDR), which was inserted 24 h pos-A.I. and remained intravaginally for a period of 25 days and at CIDR withdrawal, a CIDR that was previously used during estrus synchronization was reinserted and remained for a further period of 10 days, totaling 35 days of exogenous  $P_4$  after A.I. Blood samples were obtained from the jugular vein to determine  $P_4$  concentration at 48 h intervals during the first 35 d, and at 72 h intervals from day 35 to 50. Progesterone levels from ewes in the IACP group were higher ( $P < 0.05$ ) than in ewes from IASP group except on days 5 and 25. Pregnancy rate was monitored by ultrasound, on days 25, 35 and 50 to follow development of embryos in both groups. Ultrasonography at d 25, showed no differences in pregnancy rate in both groups, however, by day 35, the percentage of pregnant ewes decreased the IASP group ( $P < 0.05$ ) compared with group IACP. Addition of  $P_4$  through a CIDR for a period of 35 days, showed that pregnancy rates can be maintained, which does not occur in females without additional  $P_4$ .

**Keywords:** Synchronization, Artificial Insemination, Pregnancy, Progesterone.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios y el apoyo para la realización de mi investigación.

A México porque a través de los impuestos del gobierno hace posible que los estudiantes de posgrados tengamos recursos necesarios para realizar dichos estudios.

Al Colegio De Posgraduados y muy especialmente a mi consejo particular por el apoyo en todo momento para realizar esta tesis con mis estudios de posgrado.

Al Instituto Nacional De Ciencias Médicas Y Nutrición “SALVADOR ZUBIRAM” por el apoyo brindado en la investigación con la determinación de los niveles séricos de progesterona en sangre.

A la línea prioritaria de investigación (L.P.I), por su apoyo parcial en la elaboración de esta tesis.

Dra. Ma. Teresa Sánchez-Torres Esqueda, por su paciencia, amistad, confianza y consejos otorgados durante mi programa de maestría.

Dr. Octavio Mejía Villanueva, por su amistad, apoyo en el mi programa de investigación antes y durante mi maestría.

Dr. Lorenzo Olivares Reyna, por la confianza y apoyo recibido durante mi posgrado.

Al Biol. Mario Cárdenas, por el apoyo otorgado en la determinación de niveles séricos de progesterona.

Al Mvz José Luis Cordero Mora, por su apoyo y sugerencias para el enriquecimiento y elaboración del presente trabajo.

## DEDICATORIA

*A Dios.*

*Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.*

*A mis padres*

*Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su infinito amor.*

*A mis familiares.*

*A mis hermanos EVA, RAMON Y ELIZABETH por ser el ejemplo de unos hermanos maravillosos que siempre han estado conmigo en mis aciertos y momentos difíciles; y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de mis sueños.*

*¡Gracias a ustedes!*

*A mis maestros.*

*Dra. MA. Teresa Sánchez-Torres E. por su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis; al Mvz José Luis Cordero Mora por su amistad, por su apoyo ofrecido en este trabajo, por su tiempo compartido y por impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional.*

*A mis amigos.*

*Que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional. A mi amigo Rafael Nieto Aquino por brindarme su amistad incondicional en todo momento y apoyarme siempre. Al Veterinario José Luis cordero Mora por estar apoyándome y brindarme consejos profesionales.*

## CONTENIDO

I.- INTRODUCCIÓN .....	1
II.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Ciclo estral de la oveja .....	4
2.2 Control endocrino del ciclo estral .....	4
2.3 Endocrinología de la foliculogénesis .....	5
2.3.1 Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) .....	5
2.3.2 Hormona folículo estimulante (FSH) .....	5
2.3.3. Hormona luteinizante (LH) .....	6
2.3.4 Estrógenos .....	7
2.3.5 Progesterona (P <sub>4</sub> ) .....	8
2.3.6 Prostaglandina F <sub>2</sub> α.....	9
2.4 Crecimiento y desarrollo folicular .....	9
2.5 Cuerpo lúteo .....	10
2.5.1 Esteroidogénesis lútea.....	11
2.5.2 Síntesis de progesterona por el CL.....	12
2.6 Luteólisis.....	12
2.7 Reconocimiento de materno .....	14
2.7.1 Oveja .....	14
2.7.2 Señales en ovejas .....	16
2.7.3 La expresión de receptores de estrógeno (E <sub>2</sub> ) y progesterona (P <sub>4</sub> ) .	17
2.8 Progestamedinas, mediadores de los efectos de la P <sub>4</sub> .....	17
2.8.1 Factores de crecimiento mediados por progesterona .....	18
2.8.2 Factores de crecimiento derivados de células estromales .....	18
2.8.3 Factor de crecimiento de fibroblastos 10 (FGF-10) .....	18
2.8.4 Factor de crecimiento de fibroblastos 7 (FGF-7) .....	19
2.8.5 Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).....	19
2.9 Importancia del interferon tau para el reconocimiento materno .....	20
2.9.1 La transducción de señal vía IFN tau .....	20
2.9.2 Genes estimulados por interferón (ISGs) .....	21
2.10 Implantación .....	22



2.10.1 Estrógenos placentarios y los factores de endometrio .....	22
2.10.2 Proteínas de la matriz extracelular (ECM) e integrinas .....	23
2.10.3 La adhesión celular y la implantación .....	24
2.11 Efectos de la progesterona en la modulación de útero.....	25
2.11.1 Modificación morfofisiológica del útero .....	25
2.11.1 Proteínas uterinas/endometriales (UTMP) .....	26
2.11.2 La Osteopontina (OPN) .....	27
2.12 Blastogénesis .....	28
2.13 Mortalidad embrionaria .....	32
2.14 Etiología de la muerte embrionaria temprana.....	32
2.14.1 Factores genéticos.....	33
2.14.2 Alteraciones endócrinas.....	33
2.14.3 Muerte embrionaria tardía.....	34
2.14.4 Mortalidad embrionaria relacionada con fallas o carencias de la receptividad uterina .....	34
2.16 Ultrasonografía .....	35
III.- MATERIAL Y METODOS.....	37
3.1 Descripción del área de estudio .....	37
3.2 Animales.....	37
3.3 Metodología .....	37
3.4 Técnica de Inseminación Artificial .....	38
3.5 Toma de muestras y análisis de progesterona .....	39
3.6 Diagnóstico de gestación en las hembras .....	39
3.7 Análisis estadístico .....	40
IV.-RESULTADOS .....	41
4.1 Inicio del estro.....	41
4.2 Concentraciones de P <sub>4</sub> durante la sincronización de estros.....	41
4.3 Diagnóstico de gestación al día 25 .....	44
4.4 Diagnóstico de gestación en los días 35 y 50 .....	44
V.-DISCUSION .....	45
VI.- CONCLUSIONES.....	51

VII.-REFERENCIAS ..... 52

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Programa reproductivo y de manejo durante el periodo experimental.....40
- Figura 2.** Tiempo de presentación de estros en ovejas primaras sincronizadas con un protocolo a base de progestágeno más la aplicación de una prostaglandina. IACP= Inseminación Artificial + P<sub>4</sub>; IASP= Inseminación Artificial Sin Aporte de P<sub>4</sub>.....41
- Figura 3.** Concentración de progesterona (ng/mL) durante la sincronización de estro. IACP= Inseminación Artificial + P<sub>4</sub>; IASP= Inseminación Artificial Sin Aporte de P<sub>4</sub>.....42
- Figura 4.** Concentraciones de progesterona durante los primeros 25 días pos inseminación. IACP= Inseminación Artificial + P<sub>4</sub>; IASP= Inseminación Artificial Sin Aporte de P<sub>4</sub>.....42
- Figura 5.** Concentraciones de progesterona (ng/mL<sup>-1</sup>) de los días 25 al 50, posteriores a la inseminación artificial. IACP= Inseminación Artificial + P<sub>4</sub>; IASP= Inseminación Artificial Sin Aporte de P<sub>4</sub>.....43
- Figura 6.** Concentraciones de progesterona del día 25 al 50 pos inseminación en ovejas de ambos grupos. IACP= Inseminación Artificial + P<sub>4</sub>; IASP= Inseminación Artificial Sin Aporte de P<sub>4</sub>. \* P<0.05.....43
- Figura 7.** Porcentaje de gestación ambos grupos a los días 25, 35 y 50 post IA. IACP= Inseminación Artificial + P<sub>4</sub>; IASP= Inseminación Artificial Sin Aporte de P<sub>4</sub>. \* P<0.05.....44

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Porcentajes de gestación a los días 25, 35 y 50 en ovejas primaras con aporte de progesterona (IACP) y sin aporte de P <sub>4</sub> (IASP).....	44
--	----

## I.- INTRODUCCIÓN

En rumiantes, las pérdidas en la gestación se concentran durante el desarrollo embrionario temprano (Inskeep, 2002), durante los primeros 42 días después del servicio, la secreción de la progesterona lútea es esencial para que se logre una gestación exitosa, para la ovulación de ovocitos sanos, para el mantenimiento del estado de reposo uterino, así como para el desarrollo y la supervivencia del embrión y por consecuencia para tener un parto normal (McDonald *et al.*, 1952).

Durante la fase lútea anterior e inmediatamente después del estro en animales no gestantes, la progesterona regula el establecimiento y la sincronización de los mecanismos para la regresión lútea (Garrett *et al.*, 1988.). Por los mismos mecanismos, la progesterona prepara el útero para el reconocimiento materno de la preñez (Vincent *et al.*, 1986). La concentración de progesterona regula el desarrollo folicular mediante una retroalimentación negativa de la frecuencia de pulsos de la hormona luteinizante (LH), (Kinder *et al.*, 1998).

Las concentraciones de progesterona se han visto implicadas en las muertes embrionarias en los siguientes períodos:

1. El período post-ovulatorio temprano en el día 6 después del apareamiento en que se han desarrollado los folículos persistentes en condiciones de bajas concentraciones de progesterona ( $P_4$ ) durante la fase lútea precedente, cuando la secreción excesiva de  $PGF_{2\alpha}$  puede ser embriotóxica y luteolítica, ya que si la progesterona no está presente antes de celo, el útero no presenta receptores para la progesterona.
2. Durante el reconocimiento materno de la gestación del día 14 al 17, cuando las bajas tasas de gestación se han asociado con bajas concentraciones de progesterona y elevadas concentraciones de estradiol-17 $\beta$ .

3. El embrión generalmente muere antes de la regresión lútea, esto ocurre en el último período embrionario, del día 28 a 42, cuando la placentación y la implantación se presentan con bajos niveles de  $P_4$ , y por tal motivo hay pérdida embrionaria.

El aporte exógeno de  $P_4$  después de la inseminación artificial (IA) ha sido estudiado por los efectos positivos que puede tener en las hembras, ya que se ha observado que puede aumentar el porcentaje de preñez y disminuir de manera considerable la mortalidad embrionaria que se presenta antes del reconocimiento materno; dichas pérdidas pueden reducirse mediante un reconocimiento precoz y la implementación de un manejo integral, zosanitario adecuado para disminuir esa mortalidad al controlar factores extrínsecos al hato (Bavera, 2007).

La  $P_4$  es considerada como la hormona de la gestación por su papel fundamental en el desarrollo y supervivencia del embrión. A través de su receptor inhibe la liberación de GnRH hipotalámico durante la fase lútea temprana, así como la expresión uterina de receptores para  $E_2-\alpha$  y de receptores para oxitocina (ROT), lo que interfiere con el desarrollo folicular ovárico. La progesterona es esencial en la fase de implantación al estimular la producción de proteínas endometriales o histotrofo, cuya modificación resultante de mayores niveles de  $P_4$  se ha relacionado con un mayor crecimiento y desarrollo embrionario (Spencer *et al.*, 2004).

La pérdida embrionaria precoz en ganado es difícil de estudiar porque no hay pruebas con sensibilidad similar a las que se usan para mujeres y yeguas. En rumiantes la tasa de fertilización después de la IA en la mayoría de los casos es alta (80%); mientras que la tasa de supervivencia embrionaria disminuye hasta 56% en la segunda semana post inseminación (Sreenan y Diskin, 1980). Por lo tanto, las pérdidas substanciales de gestación se presentan dentro de las dos primeras semanas post inseminación.

Este reconocimiento requiere que el concepto se transforme de esférico hacia una forma elongada para generar una mayor superficie de contacto (precontacto) con

el epitelio uterino, con la finalidad de desencadenar la producción del factor antiluteolítico conocido como interferón tau (IFN- $\tau$ ); producción regida entre otros por el estado de desarrollo embrionario (Binelli *et al*, 2001).

Las bajas concentraciones de progesterona pueden tener como consecuencia concentraciones excesivas de otras hormonas, como las hormonas luteolíticas que pueden causar la muerte del embrión. Por lo anteriormente mencionado, la presente investigación tuvo como finalidad determinar el efecto del aporte exógeno de P<sub>4</sub> durante los primeros 35 días después de la I.A en ovejas.

## **II.- REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Ciclo estral de la oveja**

La oveja (*Ovis aries*) pertenece a la familia bovidae, se caracteriza por ser un animal poliéstrico estacional debido a que presenta varios ciclos estrales pero confinados a una estación del año (Bearden y Fuquay, 1984), esto sucede durante los días de menos horas luz en donde es secretada una mayor cantidad de melatonina, la cual actúa como un reloj biológico proporcionando información acerca del fotoperiodo (Valencia *et al.*, 2005), su acción principal es el control de GnRH, cambiando la sensibilidad hipotalámica a los estrógenos con un efecto mediado por la dopamina que aumenta la sensibilidad al efecto inhibitorio del estradiol, en tanto que la melatonina reduce la producción de dopamina a través de acciones enzimáticas, logrando obtener un incremento en la secreción de LH (Galina y Valencia, 2006), sin embargo; existen razas que no son tan afectadas por el fotoperiodo y presentan ciclicidad durante todo el año (Macedo y Alvarado, 2005).

El ciclo estral se define como el intervalo entre dos estros donde se presentan cambios morfológicos y de comportamiento en la hembra, desde un punto de vista biológico permite la foliculogénesis, la ovulación y la formación de un cuerpo lúteo, así mismo el transporte de gametos tanto masculinos como femeninos para la fecundación y la implantación del propio cigoto (Frandsen, 1988), en la oveja tiene una duración aproximada de 17d, existiendo alguna variación por la diferencia entre razas, etapa de estación reproductiva y efectos ambientales (Hafez y Hafez, 2002).

### **2.2 Control endocrino del ciclo estral**

El control del ciclo estral de la oveja es el resultado de la interacción de cuatro órganos distintos: hipotálamo, hipófisis, ovario y útero, ellos se encuentran comunicados principalmente a través de seis hormonas: hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) producida en el hipotálamo, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH), producidas en hipófisis; estradiol ( $E_2$ ) y progesterona ( $P_4$ ), sintetizadas



y liberadas desde el ovario y por último la prostaglandina ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) liberada por el útero (Goodman, 1994). La secreción de gonadotropinas es controlada por mecanismos de retroacción que involucran al sistema nervioso central (SNC), la hipófisis anterior y las gónadas. El eje hipotálamo–hipófisis-gónadas es influenciado por factores externos vía sistema nervioso central y este asegura la secreción de gonadotropinas, si es que existe una relación apropiada entre factores como: duración del día (fotoperiodo), temperatura ambiental, disponibilidad de alimento y condiciones físicas para la receptividad sexual (Fink, 1988).

## **2. 3 Endocrinología de la foliculogénesis**

### **2.3.1 Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH)**

La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es un decapeptido (10 aminoácidos) con peso molecular de 1183 Da (Hafez y Hafez, 2002) y es secretada por el hipotálamo y transportada por el sistema portal hipofisario (Skinner *et al.*, 1998) que induce la descarga preovulatoria de la LH y en consecuencia la ovulación. Durante el ciclo estral, la GnRH es secretada en forma pulsátil, su frecuencia y amplitud de los pulsos varía con la etapa del ciclo (Moenter *et al.*, 1991). Estos cambios en el patrón de secreción de GnRH ocasionan una secreción de gonadotropinas, que es requerida para regular los cambios en la actividad cíclica del ovario. Así mismo, los cambios en la secreción hormonal del ovario regulan la secreción de gonadotropinas mediante un mecanismo de retroacción positivo o negativo, según sea el caso (Karsh *et al.*, 1997).

### **2.3.2 Hormona folículo estimulante (FSH)**

La FSH estimula el crecimiento y maduración del folículo ovárico, de forma conjunta con la hormona luteinizante (LH) estimula la producción de estrógenos en el ovario (Hafez y Hafez, 2002). Se han establecido algunas características del patrón de secreción de la FSH, observándose una primera elevación que coincide con el pico preovulatorio de LH y una segunda elevación 24 a 28 h después, cuando las concentraciones de LH han disminuido; por último, la secreción FSH disminuye hacia

un nadir a la mitad de la fase lútea, permaneciendo en ese nivel hasta la onda preovulatoria del siguiente ciclo (Souza *et al.*, 1997).

Los valores máximos de los picos de secreción de FSH están entre 133 y 177 ng/mL<sup>-1</sup>, en tanto que sus valores medios durante el resto del ciclo estral se encuentran alrededor de 2.8-6.8 ng/mL<sup>-1</sup> (Pant *et al.*, 1977). Karsh *et al.* (1984) mencionan que la FSH puede tener una función permisiva en el desarrollo folicular debido a que las concentraciones circulantes son suficientes para permitir el crecimiento y maduración de folículos en cualquier momento del ciclo estral. La FSH también estimula en las células de la granulosa la secreción de factores reguladores como inhibina, activina y folistatina, entre otros factores, los cuales modulan la producción de estradiol y andrógenos que, a su vez regulan los efectos de la FSH (Picazo y López, 1995).

### **2.3.3. Hormona luteinizante (LH)**

La LH es una glucoproteína secretada por la hipófisis anterior cuyos niveles basales actúan con la FSH para inducir la secreción de estrógenos en los folículos de Graaf que han alcanzado su máximo desarrollo. La LH, presenta dos tipos de liberación durante el ciclo estral, la secreción tónica durante la fase progestacional a lútea y la cíclica a preovulatoria durante el estro, en ambos casos dicha liberación es regulada a través de la acción combinada de la progesterona (P<sub>4</sub>) y de los estrógenos que se secretan en el cuerpo lúteo (CL) y en folículos, respectivamente. Por otro lado, la elevación preovulatoria de LH es responsable de la ruptura de la pared folicular y la ovulación (Murdoch, 1985).

En todas las especies la LH juega un papel crítico en el mantenimiento de la función lútea: interactúa con sus propios receptores, incrementando su concentración y número a partir de la ovulación, hasta alcanzar su liberación máxima durante la fase lútea media. La concentración de LH durante la fase lútea es de 3 a 5 ng/mL<sup>-1</sup> y se libera con una frecuencia de un pulso cada 3-4 h (Karsh *et al.*, 1997).

Hacia el final de dicha fase del ciclo estral, poco antes del inicio del estro, la frecuencia de los pulsos de LH se incrementa a un pulso cada 30 minutos para estimular la

maduración de los folículos. Alrededor del estro, cuando la concentración de  $P_4$  es menor a  $1 \text{ ng/mL}^{-1}$ , la frecuencia de liberación de LH es de 1 pulso/h induciendo así la onda preovulatoria de LH. Los valores registrados durante el pico preovulatorio de LH varían de 30 hasta  $250 \text{ ng/mL}^{-1}$  en ovejas primíparas y adultas, teniendo una duración de 12 a 24 h (Karsh, 1984). Este patrón de secreción es regulado por la acción de los estrógenos del folículo mediante un mecanismo de retroacción positiva sobre el área pre-óptica y el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (Karsh, 1984).

Se ha demostrado que la secreción de LH en hembras castradas es mayor que en hembras enteras, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de control por retroacción negativa proveniente del ovario, el cual ejerce su efecto sobre el eje hipotálamo-pituitaria (Karsh *et al.*, 1984; Niswender y Nett, 1988). Así, la liberación tónica de la LH se regula también, durante los momentos posteriores al estro, a través de un mecanismo de retroacción negativa, por el cual al aumentar la concentración de  $P_4$ , disminuye la frecuencia de los mismos por inhibición de la descarga pulsátil de LH (Karsh, 1984; Whisnant y Goodman, 1988).

#### **2.3.4 Estrógenos**

Entre los cambios hormonales que se observan durante el ciclo estral de la oveja, se incluyen variaciones en la concentración de los estrógenos, especialmente las del  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), cuya máxima concentración ocurre durante el periodo preovulatorio, no obstante, se ha observado un primer aumento dos a tres días antes del pico preovulatorio de LH y otro durante la fase lútea temprana (Downey, 1980). Otros investigadores como Hauger *et al.* (1977) han reportado un aumento en los valores de estrógenos a la mitad del ciclo estral coincidiendo con la oleadas foliculares.

El pico preovulatorio de los estrógenos inicia 12 a 14 h antes del estro a partir de una concentración basal ( $11 \text{ pg/mL}^{-1}$ ) y alcanza valores mayores a  $21.1 \text{ pg/mL}^{-1}$  entre -8 y 0 h antes del estro, observándose nuevamente valores basales de 2 a 10 h después de iniciado el estro; la elevación de los estrógenos tiene una duración de 16 a 22 h (Pant *et al.*, 1977). La síntesis de estrógenos ocurre en los folículos antrales o preovulatorios.

En ovejas se ha observado que el aumento de LH eleva la producción de estrógenos en los folículos, lo cual sugiere que la secreción de estrógenos depende de la LH y en consecuencia de la presencia de andrógenos aromatizables (Downey, 1980).

Durante la fase folicular tardía, un notable aumento en la concentración de  $E_2$ , induce la presentación de un marcado incremento (pico) en la secreción de GnRH, debido al efecto de retroacción positiva que ejerce el esteroide sobre el hipotálamo medio basal (Suzanne *et al.*, 1990), mediante el cambio de un patrón de secreción pulsátil a otro que lleva a cabo una descarga ininterrumpida del decapeptido (Evans *et al.*, 1995). La previa exposición (priming) del ovario a  $P_4$  durante la fase lútea es importante para la expresión completa de dicha retroacción positiva del estradiol sobre la secreción de GnRH (Caraty y Skinner, 1999).

### **2.3.5 Progesterona ( $P_4$ )**

En el ciclo reproductivo de las ovejas, la progesterona actúa como el esteroide ovárico dominante presente en la circulación periférica. Concentraciones basales ( $0.2 \text{ ng/mL}^{-1}$ ) se observan desde uno o dos días antes del estro hasta cuatro días después; a partir del quinto día, la concentración aumenta de 2 a  $4 \text{ ng/mL}^{-1}$  disminuyendo a partir del día 14 día del ciclo estral, hasta alcanzar concentraciones basales (Quirke *et al.*, 1979).

Durante la fase lútea, las crecientes concentraciones de progesterona secretadas por el cuerpo lúteo son capaces de bloquear la ocurrencia tanto del pico de GnRH como el de la LH, lo que indica que, en la oveja, la  $P_4$  modula la frecuencia en los pulsos de GnRH y subsecuentemente LH, por medio de un sistema de acción central altamente sensible y específico que involucra sus propios receptores a nivel neuronal (Goodman y Karsh, 1980; Skinner *et al.*, 1998). Después de la luteólisis, las concentraciones de  $P_4$  disminuyen rápidamente hasta llegar a niveles casi indetectables, permitiendo que la secreción de GnRH deje de ser inhibida (Hadley, 1988).

El ambiente endocrino al cual ha sido expuesto el folículo antes de ovular posee una influencia fundamental en la posterior función del cuerpo lúteo. Las fases lúteas inadecuadas están caracterizadas por niveles subnormales de progesterona (menores

de  $1.5 \text{ ng/mL}^{-1}$ ) las cuales pueden estar o no asociadas con una destrucción prematura del cuerpo lúteo. Existen varios mecanismos probables involucrados con la etiología de un cuerpo lúteo subnormal. En resumen,  $P_4$  y  $E_2$  ejercen secuencialmente efectos opuestos de retroacción en la secreción de GnRH durante el ciclo estral de la oveja, sin embargo existe también una evidencia clara de que los sistemas afectados por estos esteroides se encuentran íntimamente relacionados, dando lugar a una secreción preovulatoria masiva de GnRH, la cual controla la ovulación y el comportamiento de estro (Caraty y Delaleux, 2001).

### **2.3.6 Prostaglandina $F_{2\alpha}$**

En la década de los 30's, fue descubierta una sustancia en los extractos de semen humano y de las vesículas seminales del borrego, la cual causaba contracción de los músculos lisos y cambios en la presión sanguínea (Hadley, 1988).

En los días 12-14 del ciclo estral (fase lútea tardía), el útero comienza a incrementar la secreción de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) la cual interfiere la unión de la LH con el sistema de la enzima adenilato ciclasa de la células lúteas, impidiendo la producción de  $P_4$ . El cuerpo lúteo (CL) es particularmente vulnerable a la acción luteolítica de la  $PGF_{2\alpha}$  durante los largos periodos entre uno y otro pulso de LH. Simultáneamente, la  $PGF_{2\alpha}$  estimula la liberación de oxitocina por parte del CL, misma que estimula al útero para liberar aún más  $PGF_{2\alpha}$ . Eventualmente la producción de  $PGF_{2\alpha}$  es suficiente para que ocurra la regresión de CL (Baird, 1981). La luteólisis es funcional y estructural observándose la disminución de la secreción de la progesterona y del tamaño del cuerpo lúteo.

## **2.4 Crecimiento y desarrollo folicular**

La foliculogénesis es el proceso del crecimiento y desarrollo folicular en el cual se observa la aparición sobre la superficie ovárica de folículos en diferentes fases de desarrollo que llegan atresia y son remplazados por otros que llegaran a ovular.

La presencia de moduladores autócrinos y parácrinos dentro del ovario influyen en la dinámica folicular. Entre estos moduladores se hallan los leucocitos, inhibina, activina, folistatina, glucosaminoglicanos, oxitocina, proteína parecida a la GnRH, renina-angiotensina, sustancia P, inhibidor de la luteinización, inhibidores de la unión de gonadotropinas, proteínas placentarias, factores de crecimiento, activador del plasminógeno, lisozimas, iones, esteroides, albumina y ácido ascórbico (Edward, 1974; Johnson y Smith, 1985; Adashi *et al.*, 1986; Driancourt y Fry, 1988; McNeilly y Baird, 1989; Tonetta y Dizerega, 1989; Castonguay *et al.*, 1990; Driancourt, 1991).

Otros autores han señalado que la progesterona es un importante regulador del desarrollo folicular, ya que durante la fase lútea en los primates y rumiantes se observa un aumento en el número y tamaño de los folículos (Dizerega y Hodgen, 1981; Coleman y Dailey, 1983). La progesterona tiene un efecto directo en el ovario de la borrega, disminuyendo la secreción de estradiol de los folículos grandes, pero aumentando la habilidad de los demás para unir hCG a la teca (Matton *et al.*, 1981; Sirois y Fortune, 1988).

## **2.5 Cuerpo lúteo**

El cuerpo lúteo es una glándula ovárica endocrina y transitoria, resultado del crecimiento y diferenciación que presentan las células de la teca y granulosa después de la ovulación. Esta glándula secreta progesterona oxitocina, relaxina, vasopresina, prostaglandinas y estradiol. De estos productos, la progesterona es el regulador más importante de la duración del ciclo reproductivo de la hembra.

La progesterona tiene como principal función, la de preparar el sistema reproductor para dar soporte a la gestación y proveer de nutrientes al embrión. Además, controla la actividad secretora del oviducto al promover vascularización del estroma y regular el contenido del glucógeno celular, bloquea las concentraciones miométriales y cuando aumentan los niveles de progesterona el cérvix produce un moco altamente viscoso que crea una barrera efectiva entre el útero y el ambiente externo. En la glándula mamaria promueve el desarrollo lóbulo-alveolar y a nivel hipotalámico parece controlar

al generador de pulsos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH); este control se manifiesta en pulsos de LH menos frecuentes y más amplios durante la fase lútea. Los efectos de la progesterona en la secreción de FSH son menos claros; sin embargo, este esteroide parece no afectar la secreción de FSH. La progesterona junto con el estradiol regulan las contracciones del oviducto favoreciendo el transporte del ovulo hacia el útero. Una exposición previa al estradiol favorece la respuesta de los órganos blanco a la progesterona, debido a que el primero induce la formación de receptores para progesterona (Niswender y Nett, 1988).

El mantenimiento de una secreción adecuada de progesterona es importante, por la necesidad que existe de la presencia de esta hormona para favorecer la implantación del blastocisto; después de la implantación, la secreción de progesterona es esencial para mantener al útero quiescente y con un ambiente que favorezca el desarrollo embrionario continuo (Keyes y Wiltbank, 1988).

Una función lútea subnormal ha sido asociada con problemas de fertilidad e incapacidad para mantener una gestación. Esta característica del cuerpo lúteo se ha reportado en primates, borregas y vacas. Una función lútea subnormal se refiere a la existencia de un CL de corta duración; o bien de una duración normal pero baja producción de progesterona o de corta duración y una baja producción de progesterona (Gaverick y Smith, 1986).

### **2.5.1 Esteroidogénesis lútea**

En roedores, las células lúteas siguen sintetizando androstenediona y estradiol, convirtiéndose en un sitio sustancial de la biosíntesis de la progesterona. Esto contrasta con lo que sucede en el folículo, en donde la progesterona sirve principalmente como sustrato para la producción de estradiol. El cuerpo lúteo (CL) expresa altos niveles de proteínas clave implicados en la absorción, la síntesis y el transporte de colesterol, y en el procesamiento de colesterol a progesterona, andrógenos, así como a estrógenos. Estas proteínas son las encargadas de la

regulación de las hormonas trópicas como prolactina (PRL), hormona luteinizante (LH) y estradiol ( $E_2$ ) (Stocco *et al.*, 2007).

### **2.5.2 Síntesis de progesterona por el CL**

El cuerpo lúteo sintetiza progesterona a partir del colesterol circulante, de la liberación de esteres de colesterol o del colesterol sintetizado *de novo* o a partir del acetato. Para que se lleve a cabo la síntesis de  $P_4$ , se requiere de una serie de enzimas, entre ellas, un complejo enzimático que rompe a la cadena colateral del colesterol P-450scc y la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD) (Niswender y Nett, 1988; Rotchild, 1981).

Una vez que el colesterol llega a la membrana mitocondrial interna, su transformación comienza en las hormonas esteroideas. La capacidad de transformar colesterol en progesterona es una característica del CL y depende de la P450scc mitocondrial y una de las seis isoformas de la  $3\beta$ -HSD,  $3\beta$ -HSD tipo II ( $3\beta$ -HSD-II), que se encuentran en el retículo endoplásmico liso (Stocco, 2006). La formación de la CL se acompaña de un aumento dramático en la expresión de ambas enzimas (Hedin *et al.*, 1987) y en los organelos que los albergan (Okamura *et al.*, 1972), permitiendo que el CL sintetice grandes cantidades de progesterona. Ambas enzimas se expresan en el CL durante toda la gestación (Goldring *et al.*, 1987; Kaynard *et al.*, 1992), sin embargo, diversos investigadores han demostrado que pueden ser regulados por PRL y gonadotropina (Martel *et al.*, 1990; Kaynard *et al.*, 1992).

### **2.6 Luteólisis**

En ausencia de gestación el cuerpo lúteo sufre una regresión morfológica y funcional, este proceso es denominado luteólisis y se caracteriza por un cese en la producción de progesterona, una ruptura de los componentes celulares, una disminución del riego vascular, proliferación del tejido conectivo, degeneración y fagocitosis de las células lúteas, el aspecto funcional más importante que se afecta es la síntesis de progesterona, la cual declina rápidamente una vez iniciada la luteólisis. Esta ha sido analizada en dos pasos, aparentemente consecutivos: a) luteólisis funcional, que es la



pérdida de la capacidad de sintetizar progesterona; y b) luteólisis estructural, que es la involución del CL acompañada de la pérdida en la integridad de sus células (Zheng *et al.*, 1994).

La prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) es principal luteolisina, se produce en las células endometriales, es transportada a través de un mecanismo de contracorriente de la vena uterina, a la arteria ovárica ipsilateral al ovario donde se ha formado el CL. Para que el CL sea sensible a la  $PGF_{2\alpha}$  debe alcanzar cierto estado de madurez, caracterizado por una amplia vascularización y por la producción de progesterona que lleva a niveles mayores de 1ng/mL; esto ocurre hacia el día 5 del ciclo estral. La acción de la  $PGF_{2\alpha}$  que conduce a la luteólisis consiste en la inhibición de la esteroidogénesis y la inducción de la apoptosis, mediante el desencadenamiento de cascadas de señales que involucran hormonas como la prolactina; citoquinas como el factor de necrosis tumoral alpha ( $TNF\alpha$ ), el interferón gamma ( $IFN\gamma$ ) y el ligando fas (FasL); especies reactivas de oxígeno (ROS), endotelina-1(E1) y la proteína 70 (HSP70) de choque térmico, entre otros (Nakamura y Sakamoto, 2001).

El receptor de  $PGF_{2\alpha}$  (rPGF), es miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G y consta de siete dominios transmembranales. En el cuerpo lúteo de bovinos se han encontrado receptores para  $PGF_{2\alpha}$  en las células lúteas grandes (GCL) así como en células del endotelio microvascular. El rPGF existe en dos formas, de alta y baja afinidad, cuya expresión depende de la cantidad de oxitocina producida por las células lúteas grandes (GCL); niveles bajos de oxitocina estimulan la exposición de los rPGF de alta afinidad a los que se unen pequeñas concentraciones de  $PGF_{2\alpha}$  que en ese momento produce el endometrio. A medida que transcurre el ciclo estral, aumenta la secreción de oxitocina, lo que induce la producción de niveles altos de  $PGF_{2\alpha}$  con lo que se activan los receptores de baja afinidad que, a su vez, incrementan la secreción cada vez mayor de oxitocina con la consecuente activación de la cascada que induce la reducción en la secreción de progesterona (Olivera, 2007).

## 2.7 Reconocimiento de materno

### 2.7.1 Oveja

Los mecanismos de regulación de la respuesta de la especie ovina en el útero obedecen a señales endocrinas y parácrinas durante el ciclo estral y la gestación e implican una regulación entre tejido y célula, específicamente en la expresión de  $E_2$  y  $P_4$ . En ovejas cíclicas, el  $E_2$  y su ARNm aumentan la expresión de las proteínas en el endometrio siendo mayor su concentración en el día 1, disminuye entre los días 2 y 6 y posteriormente, aumenta entre los días 11 y 15.

En ovejas preñadas, el ARNm para  $P_4$  y la expresión de proteínas en el endometrio es bajo en el día 11, se incrementa entre los días 12 y 17, y disminuye de nuevo entre los días 18 y 25. Estudios en úteros de mamíferos han demostrado cambios celulares específicos de la expresión de receptores de la hormona durante el ciclo estral/menstrual y durante la gestación. Alteraciones temporales y espaciales en la expresión de genes de  $E_2$  y  $P_4$  se producen durante el ciclo estral y la gestación precoz en el epitelio endometrial y estroma que no se detectaron en el análisis del endometrio. Durante el ciclo estral, el endometrio libera impulsos luteolíticos de las PGF que inducen regresión del cuerpo lúteo (luteólisis). La fuente de PGF luteolítica es a través de pulsos en el endometrio, en células del endometrio luminal (LE) y epitelio glandular superficial (SGE), porque expresan receptores para OT y son la únicas células que expresan la ciclooxigenasa 2 (COX -2), una enzima importante en la síntesis de PG. El mecanismo luteolítico que se desarrolla en células del epitelio luminal y epitelio glandular superficial requiere los efectos secuenciales de progesterona, estrógenos y oxitocina, actuando a través de sus respectivos receptores (Spencer y Bazer, 2002).

Durante el estro (Día 0), los estrógenos producidos por el folículo de Graaf estimulan el incremento en expresión para el receptor  $\alpha$  para estrógeno (ER $\alpha$ ), el receptor para progesterona (PR) y el receptor para oxitocina (OTR). Durante el diestro, la progesterona del CL recién formado estimula la acumulación de fosfolípidos en epitelio luminal y epitelio glandular superficial, que pueden liberar ácido araquidónico para la síntesis y secreción de PGF. Durante diestro, los niveles de  $P_4$  aumentan y actúan

mediante los receptores para  $P_4$  (PR) para bloquear la expresión de  $ER\alpha$  y OTR en el epitelio luminal y epitelio glandular superficial (McCracken *et al.*, 1984).

Por lo tanto, la expresión de  $E_2$  y del receptor para OT (OTR) no se detecta en los días 5 al 11 del ciclo. El mecanismo molecular preciso por el que la progesterona suprime la transcripción del gen para el ER es desconocido. Sin embargo, los efectos de la progesterona en la expresión del gen del OTR pueden ser indirectos a través de la supresión del receptor  $\alpha$  para  $E_2$  ( $ER\alpha$ ) (Spencer y Bazer, 2002).

La exposición continua del útero a la progesterona durante 8 a 10 días regulan a la baja la expresión de receptores para  $P_4$  en el epitelio luminal después del día 11 y en epitelio glandular después del día 13, lo que permite un rápido incremento en expresión de  $E_2$  en el día 13 y de OTR el día 14. El mecanismo por el cual la progesterona autorregula negativamente la expresión de su PR no se conoce, pero puede implicar la disminución del PR mediado en la transcripción de genes de  $P_4$ . La oxitocina secretada el día 9 en la parte posterior de la pituitaria y/o CL, induce la liberación de pulsos luteolíticos de PGF del epitelio luminal y epitelio glandular superficial en los días 14 al 16. En respuesta a 4-5 pulsos luteolíticos de más de una PGF en un periodo de 25 h, se compromete la funcionalidad del CL y su regresión estructural, lo que permite a la oveja mostrar estro y completar el ciclo de 17 días (Spencer *et al.*, 2004).

Es evidente que las variaciones en la expresión de ER y PR son críticos para los cambios de la biología del útero, durante el ciclo estral (luteólisis) y durante el establecimiento y mantenimiento de la gestación. Durante la gestación, la expresión de genes tanto de ER y PR en epitelio luminal y glandular tienen límites que no se aprecian o están por debajo de valores detectables entre los días 15 y 25. Entre los días 20 y 140 de la gestación, los ER y PR están ausentes en epitelio luminal y epitelio glandular, pero los receptores de progesterona siguen siendo abundantes en el estroma y en el miometrio. Curiosamente, la remodelación y la morfogénesis del epitelio glandular endometrial que se produce durante la gestación pueden requerir la ausencia de expresión de PR (Spencer *et al.*, 2004).

En ovejas preñadas, los receptores de progesterona se ausentan del epitelio uterino cuando las concentraciones circulantes de progesterona son altas. Los PR son abundantes en el epitelio uterino, pero las concentraciones circulantes de progesterona están por debajo su detección. En el epitelio uterino de ratón, la progesterona inhibe la ciclina D1 inducida por estrógenos y la quinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4) después de su translocación nuclear, la ciclina E y la ciclina A - CDK2 causan la activación de la quinasa, y la proliferación celular. Por lo tanto, es probable que el ligando del PR inhiba la morfogénesis epitelial debido a los efectos negativos sobre la progresión a través del ciclo celular. La ausencia del PR después del día 15 en el epitelio germinal puede ser importante, debido a que las glándulas endometriales se someten a una gestación dependiente, ocasionada por la hiperplasia del día 16 al 50 posteriormente, la hipertrofia a partir del día 50 de gestación (Spencer *et al.*, 2004).

### **2.7.2 Señales en ovejas**

Las hembras ruminantes son ovuladoras espontáneas, estacionales que tienen ciclos estrales dependientes del útero, hasta el establecimiento de la gestación. El ciclo estral es dependiente del útero como la fuente del factor luteolítico,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Durante el ciclo estral, los cambios celulares en la expresión de receptores hormonales, controlan el desarrollo del mecanismo luteolítico endometrial. El reconocimiento materno de la gestación en ovinos exige que el concepto (embrión/ feto y su membranas asociadas) se alargue desde blastocito a su forma tubular y luego filamentosa para que produzca interferón tau ( $\text{IFN}_\tau$ ), que impide el desarrollo del mecanismo luteolítico endometrial. Este efecto antiluteolítico de IFN tau resulta en el mantenimiento de un CL funcional y, por lo tanto, la secreción de progesterona. La progesterona, la hormona de la gestación, es esencial para crear un ambiente uterino que apoye los eventos esenciales para el desarrollo del concepto hasta término (Spencer y Bazer, 2002).

### **2.7.3 La expresión de receptores de estrógeno (E<sub>2</sub>) y progesterona (P<sub>4</sub>)**

Las alteraciones en la expresión tisular y celular específica de los receptores uterinos para E<sub>2α</sub> (ER<sub>α</sub>) y para P<sub>4</sub> durante el ciclo estral y gestación temprana no pueden atribuirse únicamente a los cambios en las concentraciones circulantes de hormonas esteroides. Por lo tanto, factores producidos localmente con acción parácrina pueden estar involucrados en regular la expresión genética de receptores uterinos para E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>. Sin duda, los cambios en la expresión de receptores para E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> están involucrados en las interacciones epitelio-mesénquima que regulan la fisiología uterina, incluyendo el desarrollo del mecanismo luteolítico, crecimiento y desarrollo uterino y quietud del miometrio basado en resultados de estudios en ovinos, bovinos, cerdos, el mono Rhesus y humanos (Spencer y Bazer, 2002).

### **2.8 Progestamedinas, mediadores de los efectos de la P<sub>4</sub>**

La supresión del mecanismo luteolítico en ovejas requiere tanto de IFN-tau como de P<sub>4</sub>. Las acciones de la P<sub>4</sub> están mediadas por los receptores de progesterona (RP), pero éstos no son detectables en epitelio luminal y germinal uterino en ovejas después de 11 y 13 días de gestación, respectivamente. Sin embargo, RP se expresa en las células endometriales del estroma uterino y en las células miometriales del músculo liso uterino durante toda la gestación. Por lo tanto, las células del estroma deben responder a la progesterona y producir factores que actúan de una forma parácrina sobre células epiteliales uterinas para regular las funciones esenciales de implantación y placentación (Bazer *et al.* 1998). Este paradigma de la pérdida de RP en el epitelio uterino, como requisito previo para la implantación se ha demostrado en ovinos, bovinos, cerdos, el mono Rhesus, humanos y ratones. Por lo tanto, la implantación puede ser prevenida si células epiteliales y germinales uterinas expresan RP (Bazer, 1992).

### **2.8.1 Factores de crecimiento mediados por progesterona**

#### **2.8.2 Factores de crecimiento derivados de células estromales**

Tres factores de crecimiento son conocidos por ser secretados por las células del estroma y de actuar a través de receptores que son únicos para células epiteliales. Estos son FGF-7 o KGF, FGF-10, y HGF. Las células estromales del útero de primates expresan FGF-7 en respuesta a la progesterona, pero su regulación endocrina en miometrio, túnica muscular de las arterias y placenta no es conocida. Las FGF-7 y FGF-10 actúan a través del receptor FGF dos IIIb (FGFR2IIIb o KGFR), mientras que el receptor de HGF está codificado por el proto-oncogen c-met (receptor de HGF). Tanto FGFR2IIIb y c-met se expresan únicamente en las células epiteliales (Rubin *et al.*, 1995). HGF se expresa en fibroblastos y células del músculo liso del útero, la placenta y los ovarios en roedores, humanos, ovejas y caballos. Tanto FGF-7 y HGF actúan sobre las células epiteliales para estimular la proliferación, migración y diferenciación. Aunque FGF-7 actúa como una progestamedina, la regulación endocrina del HGF y su expresión no es clara. El útero de primate y el ovario del ratón expresan HGF en respuesta a estrógenos, pero los efectos de progesterona y andrógenos sobre la expresión de HGF en otros tejidos no han sido reportados. FGF-10 es también un factor de crecimiento derivado del estroma con actividades similares a FGF-7 y se ha relacionado directamente con el desarrollo del pulmón, cerebro y extremidades, ya que éstos no se desarrollan en ratones que carecen de FGF-10 (Sekine *et al.*, 1999).

#### **2.8.3 Factor de crecimiento de fibroblastos 10 (FGF-10)**

En ovejas adultas, los niveles de ARNm de FGF-10 son relativamente altos en las células del estroma uterinas durante la fase lútea del ciclo estral y durante el periodo de peri-implantación de la gestación temprana cuando hay altos niveles de P<sub>4</sub> circulante y la ausencia de expresión de RP en epitelio luminal y epitelio germinal uterino. FGF-10 es un candidato de progestamedina, pero su regulación endocrina del útero ovino permanece sin ser entendido. FGF-10 también se expresa por el mesénquima corioalantoico y FGFR2IIIb se expresa en el trofotodermo adyacente. Esto sugiere que

el FGF-10 media las interacciones placenta-mesénquima-trofectormales para estimular la proliferación y diferenciación de la placenta (Chen *et al.*, 2000).

#### **2.8.4 Factor de crecimiento de fibroblastos 7 (FGF-7)**

En las ovejas, la expresión de FGF-7 está relacionada con los vasos sanguíneos uterinos, lo cual es consistente con su expresión en las arterias del endometrio de primates. Sin embargo, la expresión de FGF-7 por las células del estroma proximal al epitelio luminal y epitelio germinal no se detecta en las ovejas. En el útero ovino, las células que expresan FGF-7 son un subtipo de células estromales que es diferente de aquellos que expresan FGF-10. Además, la expresión de FGF-7 en el útero ovino es muy restringida mientras que FGF-10 se expresa en todo el compartimiento del estroma proximal al epitelio luminal y germinal endometrial. Los patrones espaciales de la expresión de FGF-10 y FGF-7 que no se superponen en el útero de ovejas, sugieren roles independientes en funciones uterinas y el desarrollo del concepto (Brenner, 1997).

#### **2.8.5 Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)**

El HGF y su receptor c-met se expresan en el útero ovino durante el desarrollo uterino neonatal y en el adulto durante el ciclo estral y gestación. El HGF se expresa por las células del estroma del endometrio, mientras que c-met mRNA se localiza exclusivamente en epitelio luminal y epitelio germinal. HGF también se expresa por el mesénquima corioalantoico, y c-met se expresa por el trofectorma. HGF puede estimular la morfogénesis epitelial y su función diferenciada se requiere para el establecimiento y mantenimiento de la gestación, implantación y placentación del concepto (Rubin *et al.*, 1995). HGF regula la proliferación y la motilidad endometrial epitelial en humanos y regula las acciones del estrógeno (estromedinas) en el útero de primates (Sugawara *et al.*, 1997). La expresión de HGF en el endometrio de ovejas cíclicas es la más alta en los días 1 y 5, disminuye del día 7 al 13 y se incrementa en el día 15. En ovejas gestantes, la expresión de HGF disminuye en los días 11 y 13, se

incrementa del día 13 a los días 15 y 17, y luego disminuye en el día 19. La expresión de HGF no se afecta por la gestación en ovejas. La expresión de c-met es baja entre los días 1 y 7 y aumenta a niveles máximos el día 13 del ciclo estral en ovejas. En ovejas preñadas, la expresión de c-met aumenta en los días 11 y 15, permanece alta el día 17 y luego disminuye el día 19. La expresión del ARNm para c-met no es afectado por la gestación (Sugawara *et al.*, 1997).

En ratones, el HGF se requiere para interacciones corioalantoideas- mesenquimales-trofoblásticas, que resultan en la organogénesis placentaria. En ovinos, la expresión del c-met en trofotodermo y la expresión de HGF en mesénquima alantoideo sugieren funciones similares del HGF en el desarrollo placentario y la embriogénesis (Uehara *et al.*, 1995).

## **2.9 Importancia del interferon tau para el reconocimiento materno**

### **2.9.1 La transducción de señal vía IFN tau**

El IFN tau se expresa entre los días 10 y 21 de gestación y actúa diferencialmente en el epitelio luminal y glandular del endometrio y estroma, para regular la expresión de un número de genes (Choi *et al.*, 2001). Las acciones de IFN-tau para señalar el reconocimiento de la gestación e inducir o aumentar la expresión de un número de genes estimulados con IFN (ISGs) son dependientes de los efectos de la progesterona (Ott *et al.*, 1992). Efectos de IFN-tau están mediadas a través de un sistema de señales de transducción que parece ser similar a la de los receptores de IFN alfa/beta y a los de receptores IFN tipo I (IFNAR). El IFN-tau se une a IFNARs del Tipo I, y activa tirosinas quinasas latentes, quinasa Janus uno (JAK1) y Tyk2, que fosforilan los residuos tirosina del transductor de señal y del activador de la transcripción uno (STAT1) y STAT2. Estas dos fosfoproteínas se unen a una tercera proteína de unión de ADN, factor ISG 3 gamma o p48 (ISGF3 gamma), y el complejo de proteínas es translocado al núcleo. Este complejo factor de transcripción ISGF3 se une a un elemento de respuesta estimulado por el IFN (ISRE) presente en la región promotora del factor regulador de IFN-1 (IRF-1) e incrementa la tasa de genes de transcripción. El



IRF-1 es un factor de transcripción positivo, que se une al elemento IRF (IRF-E) y aumenta la transcripción de genes (Mamane *et al.*, 1999). Curiosamente, IRF-E frecuentemente es contenido dentro de un ISRE más grande. Aunque la proteína IRF-1 puede unirse a un ISRE que contiene un IRF-E y activar la transcripción, el complejo factor de transcripción ISGF3 puede no unirse a un solo IRF-E. La transcripción del gen para IRF-2 se incrementa mediante la unión del IRF-1 al IRF-E presente en la región promotora del gen.

IRF-2 es un factor de transcripción negativo que puede desplazar a IRF-1 y bloquear genes tales como ER $\alpha$  y los genes OTR para prevenir luteólisis (Fleming *et al.*, 2001).

### **2.9.2 Genes estimulados por interferón (ISGs)**

El IFN tipo I ejerce sus efectos biológicos al inducir la expresión de 30 o más genes estimulados por interferón (ISGs) que codifican para proteínas con propiedades antivirales, antiproliferativas, inmunomoduladoras y antiluteolíticas, incluyendo una creciente familia de factores reguladores de interferón (IRFs) (Hansen *et al.*, 1999). El IFN tau, además de suprimir o silenciar la transcripción de genes de receptores para estradiol y oxitocina (ER y OTR), induce o aumenta la expresión de un número ISGs en el endometrio de rumiantes. Estos genes estimulados por el interferón incluyen STAT1 y 2, beta2-microglobulina, IRF-1, ISG17, la proteína Mx y 2', 5' oligoadenilato sintetasa (OEA) (Johnson *et al.*, 2001). En el endometrio de las ovejas gestantes a temprana edad, así como ovejas cíclicas que reciben inyecciones intrauterinas de IFN-tau ovina recombinante, la expresión de los genes ISG17 y la OEA se incrementaron sólo en el estroma endometrial y en la parte media profunda del epitelio glandular (Johnson *et al.*, 2000).

Los resultados disponibles de estudios para determinar los efectos del ciclo estral, gestación e IFN tau en la expresión de STAT1, STAT2, IRF-9, IRF-1 y IRF-2 genes en el endometrio ovino indican que:

1. En ovejas cíclicas la expresión de STAT1, STAT2, IRF-1 y el IRF-9 es detectable a niveles bajos en el estroma y epitelio glandular;

2. La expresión de genes estimulados por interferón (ISGs) se induce o aumenta sólo en la estroma y epitelio glandular en ovejas gestantes, y
3. La expresión de IRF-2 se limita a epitelio luminal y epitelio glandular superficial tanto en ovejas cíclicas como en ovejas gestantes para silenciar la expresión de genes seleccionados, tales como los de ER y OTR, así como genes estimulados por interferón, incluyendo STAT 1 y 2, IRF-9 y los ISGs más estudiados a la fecha, incluyendo MHC Clase I y microglobulina beta2.

## **2.10 Implantación**

### **2.10.1 Estrógenos placentarios y los factores de endometrio**

La progesterona, la hormona de la gestación, desempeña un papel fundamental e indiscutible en el establecimiento y mantenimiento de la gestación en mamíferos. En el útero de mamíferos, los receptores de progesterona (PR) se expresan en el epitelio y el estroma del endometrio durante la fase lútea temprana, permitiendo la regulación directa de un número de genes por la progesterona a través de la activación de los PR. Sin embargo, la exposición continua del endometrio a la progesterona regula a la baja la expresión de PR en el epitelio endometrial (Spencer *et al.*, 1995c). La expresión de proteína del PR no es detectable en el epitelio luminal y germinal endometrial en ovejas después de los días 11 y 13 de gestación, respectivamente (Spencer y Bazer, 1995). La expresión de PR sólo se detecta en el estroma y miometrio durante la mayor parte de la gestación en el útero ovino. El paradigma de la pérdida del receptor para progesterona en el epitelio uterino inmediatamente antes de la implantación es común en ovinos (Spencer y Bazer, 1995), bovinos y otras especies.

En el cerdo, un aumento en los componentes histotrofos se produce en el lumen uterino inmediatamente después de la liberación de estrógenos del embrión en el día 11 de la gestación. Los estrógenos placentarios también actúan sobre el endometrio epitelial de manera parácrina para aumentar la expresión de factores de crecimiento específicos, incluyendo el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-I) y factor de crecimiento de fibroblastos siete (FGF-7), factor de crecimiento de queratinocitos

(KGF), y de OPN, que luego actúa sobre el trofotodermo y estimula la proliferación celular, así como en el desarrollo del concepto.

El IGF-I es un factor de crecimiento pleiotrópico requerido para el crecimiento prenatal uterino y el crecimiento y desarrollo en el ratón. En el útero porcino, el IGF-I es principalmente expresada por epitelio germinal endometrial tanto en cerdas cíclicas y como en cerdas gestantes. En el endometrio aumenta la expresión de genes IGF-1 durante la gestación temprana y presenta picos en los días 12 a 13, que coincide con la producción de estrógenos por el alargamiento del concepto. El tratamiento de cerdas ovariectomizadas o primerizas cíclicas con estrógenos aumenta la expresión de IGF-I en el útero. Receptores de IGF tipo I son detectados en el endometrio, así como en el embrión, sugiriendo modos parácrinos y autócrinos de acción del IGF-I en el microambiente uterino (Stewart *et al.*, 2000).

### **2.10.2 Proteínas de la matriz extracelular (ECM) e integrinas**

El establecimiento de la gestación en mamíferos requiere coordinadas interacciones entre el concepto y la madre, que involucran numerosas hormonas, factores de crecimiento y citocinas, que actúan a través de receptores específicos en el útero. Las secreciones uterinas juegan un papel importante en el establecimiento de la sincronía entre el desarrollo del concepto y la receptividad uterina, así como en la remodelación de concepto, la adhesión, la implantación y placentación. En ovejas, las integrinas juegan un papel dominante en las interacciones entre los ECM y receptores de ECM para traducir las señales celulares en las células epiteliales y trofotodermo del concepto. El endometrio presenta la expresión constitutiva y la expresión dependiente del ciclo de las integrinas y parece ser el único tejido conocido que presenta una expresión hormonal dependiente de integrinas. Son tres las integrinas que se consideran marcadores de la receptividad uterina para la implantación en humanos, que ocurre cuando el útero está bajo la influencia de la progesterona. El tiempo para la expresión de la alfa v-beta 3 se correlaciona con la unión del embrión y la desaparición de la subunidad de la integrina alfa 4. La presencia de alfa v-beta 3 y alfa 5-beta 5 en la superficie apical uterina del epitelio luminal, sugiere un papel para estas integrinas en

las interacciones trofotodermo-epitelio luminal durante la implantación (Burghardt *et al.*, 2002).

### **2.10.3 La adhesión celular y la implantación**

En contraste con roedores y humanos, la implantación en los animales domésticos sigue un período previo a la unión (o pre-receptivo) de 8 a 15 días. El período previo a la unión de cerdos y ovejas se caracteriza por la migración y el espaciado de los embriones en el útero y a continuación, una amplia remodelación del concepto, en que los blastocitos sufren un alargamiento filamentoso con un disco embrionario en posición central entre los días 11 y 16 de la gestación. Este período prolongado de aposición y de unión en los animales domésticos ofrece posibilidad para investigar la adhesión y las señales asociadas con eventos de transducción en las fases iniciales de implantación sin que el proceso se oculte por la rápida invasión del embrión y deciduización del estroma uterino que ocurre en los seres humanos y roedores. Las placentas en rumiantes son del tipo sinepiteliocorial formado cuando las células binucleadas del trofotodermo migran e invaden el epitelio luminal en zonas aglandulares del útero (carúnculas) y se someten a una transformación sincitial definida como una fusión de las células binucleadas con el epitelio luminal. Allí existen zonas parciales de degeneración del epitelio luminal que posteriormente son reemplazadas por células del epitelio luminal (Bowen y Hunt, 2001). En las ovejas la expresión de las subunidades de las integrinas, alfa (4,5) y beta (1,3,5) se producen tanto en el endometrio de ovejas cíclicas y gestantes, como en el trofotodermo del concepto. Estas subunidades de integrinas se presentan en zonas apicales expresándose en epitelio luminal, epitelio glandular y trofotodermo del concepto y esta expresión es constitutiva y no es influenciada por la gestación o por la presencia del producto de la concepción en ovejas. En la oveja, la receptividad de la implantación no parece implicar patrones temporales y espaciales de la expresión de la integrina, pero puede depender de la expresión de proteínas ECM tales como OPN, que son ligandos para los heterodímeros de estas integrinas. Del mismo modo, en las especies tales como cerdo, ratón y humanos las interacciones entre integrinas específicas y proteínas ECM

enmarcan la supuesta ventana de implantación. En cerdos, la progesterona aumenta la expresión de alfa - beta 1 y alfa 5-beta 1 en el período peri-implantación, que puede ser parte de la "ventana de implantación" en estas especies. El desarrollo del concepto en la etapa de blastocisto no parece requerir secreciones histotrópicas de las glándulas uterinas, sin embargo, la importancia de la secreciones endometriales en el desarrollo del concepto previo a la unión y presencia de señales de reconocimiento de la gestación se han demostrado en estudios de knock-out de las glándulas uterinas de ovejas (UGKO), (Burghardt *et al.*, 2002).

## **2.11 Efectos de la progesterona en la modulación de útero**

### **2.11.1 Modificación morfofisiológica del útero**

A lo largo del ciclo estral, la P<sub>4</sub> determina los cambios histológicos del útero. Los estrógenos estimulan la vascularidad del endometrio durante el estro y aumentan la actividad muscular uterina, en tanto que la P<sub>4</sub> provoca disminución de la motilidad y crecimiento de los epitelios de revestimiento y glandular del endometrio. Los cambios morfológicos del útero debidos al control materno, se observan en todo el órgano, mientras que el concepto los induce en la zona de preferencia para la implantación (Díaz y Hernández, 1986).

El control materno se hace principalmente a través de la P<sub>4</sub>, la cual, en la fase luteal, inhibe la expresión de algunas moléculas de la familia de factores de crecimiento (VEGF, Factor de crecimiento epidermal y sus receptores específicos), que son normalmente estimulados durante la fase folicular por acción del estradiol. Por ende, durante la fase luteal disminuye el edema y aumenta la producción glandular del útero. Por acción del EGF hay un aumento en el tamaño y función de las glándulas endometriales.

Díaz *et al.* (2002), encontraron que existe un aumento significativo en el desarrollo del epitelio durante la fase luteal del ciclo estral, además de una mayor actividad secretora. El control materno del ambiente embriotrófico sucede normalmente en todos los ciclos estrales. Si no hay una señal de reconocimiento materno habrá lisis del CL y se dará

inicio a un nuevo ciclo estral. Cuando termina el diestro, la oxitocina estimula la producción de prostaglandina  $F_{2a}$  ( $PGF_{2a}$ ) en el endometrio, principal molécula luteolítica en los rumiantes.

Los mecanismos luteolíticos que se originan en el endometrio uterino requieren de una secuencia de efectos producidos por las hormonas  $P_4$ ,  $E_2$  y oxitocina, las cuales actúan a través de sus receptores específicos. Al iniciar el ciclo estral, las vacas en celo tienen elevados niveles plasmáticos de  $E_2$  debido a la presencia de un folículo ovulatorio o de De Graff, lo cual estimula la síntesis de receptores endometriales para  $P_4$  (PR), oxitocina (OTR) y para los mismos estrógenos (ER). Durante el diestro aumentan los niveles séricos de  $P_4$  que inhibe la expresión de ER y OTR. Estas proteínas, según Spencer y Bazer (2002), no son detectables a partir del día 5 del ciclo estral y hasta los días 11 ó 12. Aunque no se conoce el mecanismo por el cual la  $P_4$  realiza bloqueo en la expresión de los ER, hay quienes consideran que los OTR podrían ser inhibidos de manera secundaria a la inhibición de los ER. La exposición prolongada de las células endometriales a la  $P_4$  (8-10 días) promueve la acumulación endometrial de ácido araquidónico y ciclooxigenasa (COX), lo cual es necesario para la síntesis de la  $PGF_{2a}$ . Luego de varios días de exposición a la  $P_4$  (8-10 días), disminuyen notablemente los niveles endometriales de PR y aumenta la expresión de ER y OTR. Se considera que el proceso negativo de autorregulación ocurre por una disminución en la transcripción de genes que codifican para los PR. La oxitocina producida por la pituitaria posterior y las células grandes del CL induce el inicio de los pulsos de  $PGF_{2a}$  en el endometrio, ésta inhibe la esteroidogénesis (luteólisis funcional) e induce a la apoptosis (luteólisis estructural), por lo que se da inicio a una nueva fase de proestro y por ende al inicio de un nuevo ciclo estral (Wang *et al.*, 2007).

### **2.11.1 Proteínas uterinas/endometriales (UTMP)**

Las secreciones uterinas son necesarias para el crecimiento de los blastocistos, su migración, implantación y activación de su genoma. En los rumiantes, el concepto está libre en el lumen uterino antes de la implantación y depende de la leche endometrial para su correcto desarrollo. El control que ejerce la  $P_4$  sobre las secreciones uterinas ha sido corroborado en experimentos donde se ha observado similitud de dichas

secreciones en hembras cíclicas y preñadas hacia los días postovulación. Las proteínas de la leche endometrial son de vital importancia para el desarrollo del concepto, pero se desconoce la función de muchas de ellas, fundamentalmente por la complejidad de la composición del proteoma (en las ovejas, está constituido por 2000-5000 polipéptidos); porque varían según el momento del ciclo estral y/o, porque más del 50% de ellas son de origen plasmático (albúmina e inmunoglobulinas). Ante estas circunstancias, es difícil el estudio de las demás proteínas secretadas por el útero. Hay algunas de ellas identificadas, como la uteroferrina y la proteína unida al retinol (RBP), que, en su orden, son fuente de hierro y retinol para el concepto, la superfamilia de las serpinas (unas de las más importantes) y algunos factores de crecimiento (Kayser *et al.*, 2006).

Las UTMP son miembros de la familia de las serpinas, que son inhibidores de la proteasa serina y sirven como marcadores de la capacidad secretora del endometrio durante la gestación en ovejas. En ovejas preñadas, la expresión de ARNm para UTMP se limita al epitelio glandular endometrial profundo y no en el epitelio luminal ni en el epitelio glandular superficial. La expresión de ARNm para UTMP está muy regulada, presentándose en epitelio glandular en los días 15 y 17 y después aumenta considerablemente durante la gestación, de una manera paralela al desarrollo y crecimiento fetal. Después del día 50, además de la hiperplasia del epitelio glandular profundo hay un aumento en la expresión del ARNm para UTMP en todo el epitelio glandular profundo. Estos cambios en la expresión de ARNm para las UTMP se relacionan con la producción de PL por el trofotodermo y por el estado de diferenciación epitelio glandular profundo durante la gestación (Ing *et al.*, 1989).

### **2.11.2 La Osteopontina (OPN)**

La OPN es una glicoproteína ácida fosfolarizada, componente de la matriz extracelular detectada en el epitelio y en las secreciones de muchos tejidos, incluyendo el tracto gastrointestinal, tiroides, riñón, mama, testículos, oviducto, útero, trofoblasto y la placenta. La OPN se une a heterodímeros de las integrinas a través de su receptor Arg-Gly-Asp (RGD) para promover la adhesión celular, propagación, la

migración y también estimula el transporte de calcio y la actividad de PI3–K (Butler *et al.*, 1996). Durante el período de peri-implantación, las glándulas endometriales producen histotropos que nutren y sostienen al concepto durante la remodelación, adhesión, implantación y placentación (Gray *et al.*, 2001). La OPN aumenta en lavados uterinos de ovejas gestantes durante el período peri- implantación (días 11 a 17), cuando ocurre la adherencia y fijación del concepto al útero. La secreción de OPN en el útero es esencial para:

- 1) Estimular cambios en la morfología las membranas placentarias extraembrionarias del concepto, y
- 2) Inducir adhesión entre el epitelio luminal y trofotodermo esencial para implantación y placentación.

## **2.12 Blastogénesis**

Comprende dos procesos fundamentales: la segmentación y la gastrulación.

La segmentación es el proceso de división y multiplicación mitótica que acontece en la trompa uterina, tras la formación del cigoto. En los mamíferos domésticos es total y equitativa, ya que durante las primeras divisiones mitóticas las células de segmentación o blastómeros se reparten por igual todo el citoplasma de la célula precursora (ooplasma). El ovulo fecundado empieza su desarrollo dividiéndose en dos células, no exactamente iguales, y cada una de estas en otras dos, y así sucesivamente, por un proceso de *segmentación* que da origen a un cúmulo de blastómeros. Estos continúan dividiéndose, con breves intervalos irregulares, en otros de tamaño diferente y no en números pares (Vatti, 1985).

En los mamíferos, el ovulo fecundado comienza su segmentación en el oviducto mientras continúa su descenso hacia el útero, al que llegará en tiempo diferente según las especies: cerca de 4 días en los rumiantes, en la cerda y la gata; 8 a 16 en los equinos y en la perra y 6 a 8 días en la mujer.



Una vez en el útero, los óvulos fecundados anidan de forma diferente sobre la mucosa; durante el desarrollo embrionario la nutrición está asegurada por el embriotrofo o “leche uterina” de Ercolani, compuesto por la secreción de las glándulas de la mucosa de la trompa, y el endometrio, cuyo tamaño y actividad han aumentado por la acción de las hormonas sexuales, especialmente la del cuerpo lúteo, y por las vitaminas A y E , algunos líquidos trasudados y sales en las especies de placentación endoteliochorial o sindesmochorial; mientras que en las especies de placentación endoteliochorial y hemochorial la alimentación del ovulo se efectúa en un principio también por histotrofo; más tarde cuando las relaciones interplacentarias se desarrollan, proviene directamente de la sangre materna ósea del sistema de simbiosis nutritiva madre-hijo, con el desarrollo trofoblástico y corioplacentario destinados a asumir la nutrición de la placenta materna a través de las vellosidades (Vatti, 1985).

Al final de la segmentación el ovulo de los mamíferos está formado por un cúmulo de células que consta de una capa periférica extraembrionaria, el trofoblasto, y una masa celular interna, encerrada en la capa periférica.

Las células del trofoblasto no toman parte en la formación del embrión, sino en la de un anexo embrional. Se inicia ahora la formación de la vesícula blastodérmica o blastocito, en la cual hay una amplia cavidad o blastocelo. En un momento dado aparece entre la masa celular interna y la capa periférica una hendidura llena de líquido que aumenta rápidamente y desciende la capa periférica empujando la masa celular interna hacia la periferia. La masa celular interna, que se denomina ahora yema o nódulo embrional, originará el embrión y las hojas embrionarias (Vatti, 1985).

La capa periférica externa, en el estado de simple plasmodio, además de la función nutritiva de las deciduas tiene la de anidación del ovulo en el espesor del endometrio por medio de actividad citolítica propia, una verdadera digestión de los elementos epiteliales de la mucosa endometrial, que destruye más o menos los elementos epiteliales de la mucosa endometrial y más o menos profundamente, según la especie. La mucosa reacciona a la actividad citolítica del trofoblasto proliferando y creciendo alrededor del ovulo, mientras que el mismo trofoblasto hace penetrar sus elementos en la pared uterina, para la anidación intersticial. En los animales domésticos sin deciduas,

el trofoblasto no tiene actividad citolítica, por lo que el embrión, en el comienzo de su desarrollo, queda libre en la cavidad uterina y no contrae con el endometrio relaciones directas de fijación, que solo se harán más tarde con el desarrollo de las envolturas fetales y de la placenta, en un periodo diferente según las distintas especies. Mientras tanto la vesícula blastodérmica, desarrollándose, aumenta de volumen y cambia profundamente de aspecto: en los roedores se hace elipsoidal, en el perro y el gato adquiere una forma de un limón; en los rumiantes y se cerdos se alarga como un tubo angosto que se retuerce entre sí mismo (Vatti, 1985).

En el nódulo embrionario, al que la formación de líquido ha estirado y empujado al polo superior del blastocisto, aparece una formación, primero discoidal y luego ovular, la zona embrionaria, en la cual se organiza el embrión. El trofoblasto, empujado hacia la periferia, forma todavía la pared de la vesícula blastodérmica, también en conexión con la zona embrionaria. Se reconocen en esta zona embrional en cierto momento, dos capas celulares sobrepuestas, independientes entre sí, una externa, superior, y una interna, profunda, que son las hojas germinativas primarias, el ectodermo y el endodermo, entre las cuales se formará en poco tiempo el mesodermo.

Desde el ectodermo embrionario surge, primero por la parte anterior y luego de las paredes laterales y posteriores, una membrana a cuya cara interna se adosa una hoja mesodérmica, completando alrededor del área embrionaria una bolsa cerrada, el amnios, que se extiende formando parte de la vesícula umbilical y luego del cordón umbilical (Vatti, 1985).

Continuando el desarrollo del embrión de una derivación del intestino posterior surge una nueva membrana, la alantoides, que en la parte inmediata extraembrional forma el conducto alantoideo, para después desarrollarse, extendiéndose en el celoma extraembrionario; este está limitado por la hoja mesodérmica de la vesícula umbilical y por la hoja parietal del mismo mesodermo, que por diversos sitios se ha adosado a la cara interna del trofoblasto, dando lugar así a la formación del corion.

Dentro del corion, el amnios forma una bolsa llena de líquido amniótico, claro, amarillento o blanquecino en cantidad de 3-4 litros en los grandes animales

domésticos, en el cual flota el feto, anclado por el cordón umbilical. La alantoides está llena de líquido alantoideo (de 4 a 12 litros). La función de estos líquidos fetales, debidos en gran parte a la actividad nutritiva del feto, es protegerlo de golpes eventuales y variaciones de presión y facilitar sus movimientos (Vatti, 1985).

Con la alantoides se originan del embrión las dos arterias umbilicales, de las que nace la red capilar alantoidea, que desemboca en las dos venas umbilicales. La parte vascularizada de la alantoides se adhiere al corion, que se vasculariza también, así se constituye el alantocorion, membrana que se comunica con la mucosa endometrial y forma la placenta fetal. De este modo, la circulación alantoidea se transforma en circulación placentaria. Estas formaciones fetales anexas, se diferencian en las diferentes especies por algunas particularidades que caracterizan a los distintos tipos de placentación (Vatti, 1985).

En la oveja y la cabra, la placenta sindesmo-corionica tiene un desarrollo y una constitución muy similares a los de la vaca; pero el engranaje de las carúnculas y los cotiledones se hace más firme, porque después de la regresión de amplias zonas del epitelio de las carúnculas, el epitelio de las vellosidades que se ha transformado en sincitio se pone en contacto con el tejido conjuntivo caruncular y con la sangre extravasada. Se inicia así en la oveja, y en ganado de menor también con posibilidad de denudación de algunos capilares del endometrio, por lo que en estas hembras el parto puede estar acompañado por una ligera hemorragia. Esta placenta tiene mayor permeabilidad que la epitelio-corionica difusa (Vatti, 1985).

En oveja y vaca, el blastocisto gradualmente se elonga y puede conseguir una longitud de 20 cm antes de unirse en la segunda y tercera semana de preñez. En cerdos, el proceso de elongación es acentuada entre 9 a 16 días de preñez, el blastocisto experimenta elongación (300 veces) cambiando de una forma esférica a extremadamente larga aproximadamente a un metro de longitud antes de iniciar la unión (Melliso, 2010).

### **2.13 Mortalidad embrionaria**

Las pérdidas prenatales como la muerte embrionaria (ME) y fetal son las causas más importantes de los fracasos reproductivos, teniendo un impacto sustancial en la rentabilidad de la producción animal (Vanroose *et al.*, 2000).

Según el Comité de Nomenclatura en Reproducción (1972), un embrión es considerado como tal después de la fertilización hasta el completo estado de diferenciación, esto es, aproximadamente al día 42 de gestación. Con base en esta clasificación, la muerte embrionaria temprana ocurre antes del reconocimiento materno de la gestación, esto es, en bovinos antes de los días 15-17, en ovinos suele ser en los días 11-13 de sus respectivos ciclos, así mismo, la muerte embrionaria tardía ocurre a partir del rescate del cuerpo lúteo hasta el estado de diferenciación embrionaria completo (Humboldt, 2001).

La ventaja biológica que produce la muerte embrionaria temprana radica en que la presentación del siguiente estro se llevaría a cabo en promedio 21 días para bovinos después del estro anterior, sin afectar un ciclo normal, dando la oportunidad a la hembra de volver a quedar gestante (Fricke *et al.*, 2002), en ovinos dado que el ciclo es más corto, la ventana de posibilidades se acorta, dándole a la hembra esa posibilidad cada 17 días.

La mortalidad embrionaria sobreviene en las dos primeras fases del desarrollo embrionario, es decir en la etapa de ovulo y en el periodo embrionario. Toda modificación del medio materno durante estos periodos puede interferir gravemente en el embrión y jugar un papel determinante en la etiología de ciertas embriopatías (Lessey *et al.*, 1996).

### **2.14 Etiología de la muerte embrionaria temprana**

Las investigaciones a nivel mundial convergen en el sentido que los principales factores que propician las pérdidas embrionarias pueden ser de tipo genético, nutricional, hormonal, ambiental y el estado de salud del animal (Vanroose *et al.*, 2000).

### **2.14.1 Factores genéticos**

Las anomalías cromosómicas son consideradas como una fuente de anomalía embrionaria en ganado bovino, ovino, equino y porcino. King (1990) estimó que estas anomalías pueden acontecer hasta en un 20% del total de las pérdidas embrionarias y fetales. Una de las principales aberraciones cromosómicas descritas en especies domésticas es la translocación Robertsoniana.

Casi el 30% de las muertes embrionarias se encuentra en líneas consanguíneas mientras menos del 15% en no consanguíneas. Esto es importante, pues en nuestro país se están cometiendo en algunas explotaciones errores genéticos graves al realizar consanguinidad descontrolada y ya existen líneas de animales altamente repetidoras en sus ciclos sexuales alterados por elevada mortalidad embrionaria. Las oportunidades de nueva concepción no se reducen en las hembras que presentan ciclos repetidos o un ciclo de mayor duración a la normal. Es decir, que la mortalidad embrionaria no tiene tendencia a ser repetida en un mismo animal, salvo en casos de consanguinidad excesiva (Catena, 2003).

Otro desorden genético que también está implicado con la muerte embrionaria es la deficiencia de uridin-5monofosfato sintetasa (UMP), esta enzima es responsable de la síntesis *de novo* de los nucleótidos de pirimidina necesarios para la construcción de moléculas de ADN y ARN. En el día 35 de gestación, Shanks y Greiner (1992) evaluaron embriones homocigóticos recesivos para este desorden y observaron que estos producían cantidades inferiores de UMP comparados con embriones heterocigóticos, y demostraron que los embriones homocigóticos pueden desarrollarse en etapas tempranas, pero mueren aproximadamente antes del día 40 de gestación.

### **2.14.2 Alteraciones endócrinas**

Al igual que en otras especies domésticas, existe un requerimiento absoluto de la progesterona para el mantenimiento de la gestación del ganado ovino. Se ha reportado que la insuficiencia primaria del cuerpo lúteo (CL) para la síntesis de  $P_4$  causa muerte

embrionaria (ME). Al respecto, la insuficiencia lútea se ha dividido en dos categorías básicas: la primera categoría incluye al CL el cual tiene una vida media corta, y la segunda categoría que incluye al CL de vida normal pero con marcada disminución en la secreción de  $P_4$  (Gaverick y Smith, 1986). De esta forma, la vida del CL durante el periodo crítico del reconocimiento materno de la gestación depende de las señales embrionarias para su mantenimiento. Como ya se mencionó en secciones anteriores, la producción del interferón Tau ( $IFN-\tau$ ) alrededor del día 12 es esencial para llevar a cabo el mantenimiento de la gestación, aunque los mayores niveles de  $IFN-\tau$  se registran en días posteriores. Sin embargo, se ha reportado que algunas de las pérdidas embrionarias se deben a la incapacidad del embrión para suprimir la cascada luteolítica durante el periodo crítico del reconocimiento materno de la gestación (Thatcher *et al.*, 2001).

#### **2.14.3 Muerte embrionaria tardía**

Considerando la clasificación de muerte embrionaria realizada por Humblot (2001), y mediante la aplicación de la ultrasonografía de tiempo real en la investigación veterinaria es posible caracterizar el parto y los porcentajes de muerte embrionaria tardía en el ganado doméstico. Bajo condiciones de campo el diagnóstico de gestación ha sido realizado de forma rápida y precisa en el día 26 pos-I.A., y su importancia fundamental se basa en comprobar la viabilidad de los embriones mediante la detección del latido cardiaco (Curran *et al.*, 1986; Kastelic *et al.*, 1991).

#### **2.14.4 Mortalidad embrionaria relacionada con fallas o carencias de la receptividad uterina**

La mortalidad embrionaria constituye un problema reproductivo que produce grandes pérdidas económicas a los productores, debido en parte a que es multicausal y a que en la mayoría de ocasiones se presenta sin alterar la duración del ciclo estral (Hernández, 1995). La mortalidad embrionaria relacionada con fallas en el establecimiento del ambiente embriotrófico puede resultar si hay defectos intrínsecos en el embrión, en el balance hormonal materno o asincronía entre la madre y el embrión, es decir que la señal de reconocimiento materno no se de en el momento

indicado (Hansen, 2002). La mayor parte de los embriones mueren entre los días 8 y 17 de la gestación (Thatcher *et al.*, 2001), por lo que no se presenta en forma aparente ningún disturbio en la duración del ciclo estral (Cullinan-Bove y Koss, 1993). El embrión puede morir al producir pocas cantidades de INF-t, por no lograr inhibir la luteólisis, por fallas genómicas o por tener algún grado de degeneración al momento en que debe darse la señal de reconocimiento (Thatcher *et al.*, 2001).

Si la falla en el ambiente embriotrófico tiene causas maternas, puede deberse a desequilibrios hormonales. Algunas vacas repetidoras tienen menores niveles de  $P_4$ , por lo cual se han implementado técnicas como el suministro de  $P_4$  exógena o la inducción de cuerpo lúteo accesorio para aumentar la tasa de preñez demostrado al realizar biopsias endometriales a vacas con ciclos normales y a repetidoras y relacionarlo con los perfiles hormonales. Se demostró que hubo cambios histológicos anormales en el útero de las vacas repetidoras con menores niveles de  $P_4$  durante su fase luteal. Por ejemplo, no se establece remodelación del útero y hay disminución marcada de las secreciones glandulares endometriales, lo cual dificultaría los procesos de migración, desarrollo e implantación del concepto (Ohtani y Okuda, 1995). Por otro lado, también pueden presentarse carencias en el ambiente embriotrófico cuando no existe una correcta sincronía entre la madre y el concepto, disminuyendo la tasa de preñez. Por tales razones, se considera que la relación entre la  $P_4$  y el INF-t, que se establece en la gestación temprana, es interdependiente en cuanto a sus funciones biológicas porque para que se lleve a cabo exitosamente el proceso de gestación, se requiere que tanto la  $P_4$  como el INF-t se encuentren en momentos, tiempos y cantidades adecuadas, de manera que se cumplan todos los eventos fisiológicos necesarios para que se establezca el ambiente embriotrófico (Thatcher *et al.*, 2001).

## **2.16 Ultrasonografía**

Desde 1950, la ecografía, ultrasonografía o scanning ha sido utilizada por muchos veterinarios en ganadería, posteriormente se comenzó a aplicar en otras especies en el diagnóstico clínico, reproductivo e investigación (Palmer y Driancourt, 1980, Kassam, 1987; Taverne y Willemse, 1989).

La versión actual es llamada «Tiempo Real» y es una versión perfeccionada en la cual se crean imágenes que son visualizadas casi instantáneamente interpretando el movimiento de los tejidos vivos (Chaffaux, 1982; Boyd *et al.*, 1988; Perkins, 2000). En 1984, se comenzó a utilizar en yeguas, y más tarde en vacas, utilizando en ambas la vía transrectal, como una herramienta importante en el manejo, diagnóstico y tratamiento de los procesos reproductivos (Pierson y Ginther, 1984).

Con el desarrollo de su tecnología, se difundió su uso en estas especies, así como en cerdas, ovejas y cabras, y hoy es un elemento diagnóstico de gran ayuda en muchos animales domésticos, e incluso en la fauna silvestre, así como en técnicas muy especializadas como la colecta transvaginal de ovocitos (Ovum Pick-Up) y el sexado fetal. Igualmente, es una técnica muy útil en investigación en el área de reproducción animal (Kassam *et al.*, 1987; Taverne y Willemse, 1989; Bellenda, 2003).



### **III.- MATERIAL Y METODOS**

#### **3.1 Descripción del área de estudio**

El estudio se realizó en la unidad de ovinos de la granja experimental del Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, ubicada en Montecillo, Municipio de Texcoco al oriente del Estado de México (19° 29' 27" de latitud norte y 98° 53' 27" longitud oeste). La altura media sobre el nivel del mar es de 2241m.

El clima es templado semiseco, con un verano fresco largo tipo C (Wo)(w) b(i'); la precipitación media anual es de 632.5 mm; el 95% de las lluvias se presentan durante los meses de verano y solo un 5% en invierno. La temperatura promedio anual es de 15.2 °C (García, 1988).

#### **3.2 Animales**

Se utilizaran 40 borregas primaras cruza de Dorset y Suffolk con una edad promedio de 1.5 años, un peso vivo de 40.5±4.8 kg y condición corporal media de 2.5 en una escala de 1 a 5 (Cottle, 1991); las cuales fueron desparasitadas con ivermectina vía subcutánea (1 ml/50 kg; Ivomec F AGVET, México), se les aplicó un complejo vitamínico (1.5 ml; VIGANTOL ADE-Bayer, México), además de ser bacterinizadas (2.5 ml/animal, BOVAC 8-Bayer, México) como tratamiento preventivo al hato.

#### **3.3 Metodología**

Las ovejas fueron sincronizadas mediante el uso de un dispositivo intravaginal impregnado de un progestágeno natural (CIDR, .3 g de P<sub>4</sub>), por un periodo de 9 d. Dos días antes del retiro del dispositivo se aplicó 15 mg de prostaglandina F<sub>2α</sub> (Lutalyse™ – Pfizer) vía intramuscular.

Se detectó la presencia de estro 24 horas después del retiro del implante, mediante la ayuda de machos celadores con mandil, cada 4 h, durante 72 h, para así determinar la hora de inicio y finalización del estro, conforme se hizo evidente la presentación del

mismo, los animales fueron enumerados con la finalidad que las que presentaron estro a primera instancia fueran inseminadas en dicho orden consecutivo. Al mismo tiempo las hembras fueron dietadas por un periodo de 36 h antes de ser inseminadas artificialmente por laparoscopia.

### **3.4 Técnica de Inseminación Artificial**

Las ovejas fueron dietadas durante 36 h antes de ser inseminadas con semen congelado (pajillas de 0.25 mL, con  $90 \times 10^6$  espermatozoides). Dado que la inseminación artificial es una cirugía menor, la tranquilización anestésica en un plano quirúrgico no profundo se realizó con una inyección intramuscular de hidrocloreuro de xilacina al 2% (Rompun<sup>®</sup>, Bayer) en una dosis de  $0.1 \text{ mL } 10 \text{ kg}^{-1}$  de peso vivo.

Posterior a la anestesia las ovejas se colocaron en posición decúbito dorsal en una mesa semi hidráulica adaptable para cirugía, reclinada a un ángulo de  $45^{\circ}$  con la cabeza del animal en la parte baja, con la finalidad de dirigir los órganos comprendidos en cavidad abdominal hacia el diafragma y así evitar daños o punciones al introducir los trocar-cánula en la pared abdominal, dejando de manera manipulable y a la vista del inseminador únicamente el aparato reproductor de la hembra (Mejía, 1997).

La parte abdominal fue rasurada y desinfectada para realizar dos trocarizaciones pequeñas en ambos lados a una distancia no mayor a los (5 cm) de la ubre, donde se introdujeron los trocar, uno para insuflar la cavidad abdominal y la otra para poder dirigir la lente del laparoscopio, en unos de los trocar se introdujo un trocar-cánula para el áspic y la pistola de inseminación conteniendo la pajilla de semen descongelado el cual fue depositado en la curvatura media de ambos cuernos uterinos (Mejía, 1997).

Para la preparación del áspic con la dosis utilizada se precedió a lo siguiente; descongelación del semen, primero se extrajo la pajilla del nitrógeno líquido el termo criogénico, posteriormente se introdujo en un baño María portátil que calienta el agua a  $37^{\circ} \text{ C}$  durante 60 segundos, una vez descongelada la pajilla se secó y cortó por el extremo sellado con alcohol polivinílico. Se utilizaron únicamente pajillas de semen de calidad y fertilidad probada previamente (Mejía, 1997).

Posterior a la inseminación artificial, las hembras fueron distribuidas al azar en dos grupos, para constituir los siguientes tratamientos: 1) Ovejas inseminadas que no recibieron progesterona ( $P_4$ ) adicional (IASP) y 2) Ovejas inseminadas que recibieron progesterona ( $P_4$ ) exógena (IACP) a través de un dispositivo intravaginal (CIDR dispositivo interno de liberación controlada de droga, Pfizer), que permaneció intravaginalmente por 25 días, al término del cual se retiró y fue sustituido por el CIDR reciclado (el que fue utilizado durante la sincronización), por un periodo adicional de 10 d, del día 25 al 35 y así poder alcanzar el día 35 pos inseminación con el aporte de progesterona exógena.

### **3.5 Toma de muestras y análisis de progesterona**

Se colectaron muestras de sangre (5 ml) de la vena yugular en tubos de propileno estériles, cada 48 h hasta el día 25 (primer diagnóstico de gestación) y posteriormente cada 72 h hasta el día 50 pos inseminación. Después de colectadas las muestras, se centrifugaron a 2.5 gravedades durante 20 minutos, el suero fue separado por decantación, posteriormente fue congelado y almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis, para determinar la concentración sérica de progesterona.

Los análisis de  $P_4$  se realizaron mediante un ensayo inmunoenzimático, la sensibilidad analítica fue de  $0.13\text{ng/mL}^{-1}$  con un coeficiente de variación intra e inter ensayo de 9.59 y 13.7% respectivamente.

### **3.6 Diagnóstico de gestación en las hembras**

Se realizaron cuatro ecografías transrectales utilizando un ultrasonido de tiempo real (SONOVET 200 MEDISON) con un transductor lineal de 7.5 Mhz por vía rectal: 1) Al inicio del estudio, para determinar el estado reproductivo de los animales y corroborar que estuvieran vacías y ciclando, 2) El día 25 pos inseminación para detectar gestaciones tempranas, verificando la presencia del embrión, 3) Al día 35 pos inseminación para dar seguimiento a las ovejas gestantes y observar aquellas que

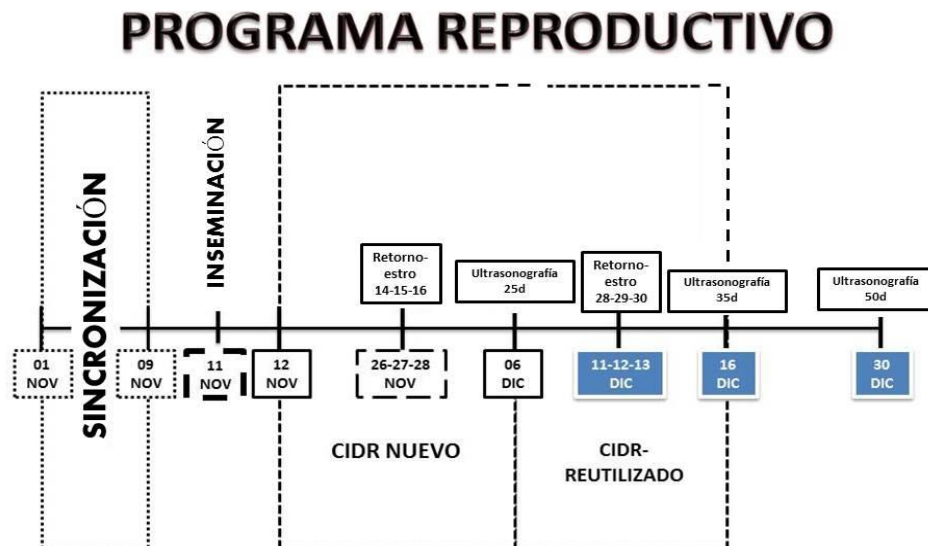
podieran de alguna manera haber sufrido de una absorción embrionaria o el fracaso de su gestación, y 4) Al término del periodo de 50 días.

La ultrasonografía se utilizó para determinar gestaciones a los 25, 35 y 50 días post inseminación artificial en ambos grupos; y se identificaron los embriones en cavidades uterinas, localizándose las primeras imágenes correspondientes a las gestaciones tempranas.

Se registró el no retorno a estro los días del 15-17 pos inseminación, dos veces al día (mañana y tarde), se utilizaron sementales celadores por periodos de 20 minutos cada uno.

### 3.7 Análisis estadístico

Se realizó un diseño completamente al azar, en donde cada oveja representó una unidad experimental. El porcentaje de presentación de estros y gestación fueron analizadas a través de la prueba de  $\chi^2$  por medio del PROC FREQ. Para inicio de estro se realizó un análisis de varianza por medio del PROC GLM y la prueba de Tukey. Todos los resultados fueron analizados mediante el paquete estadístico SAS (2002).

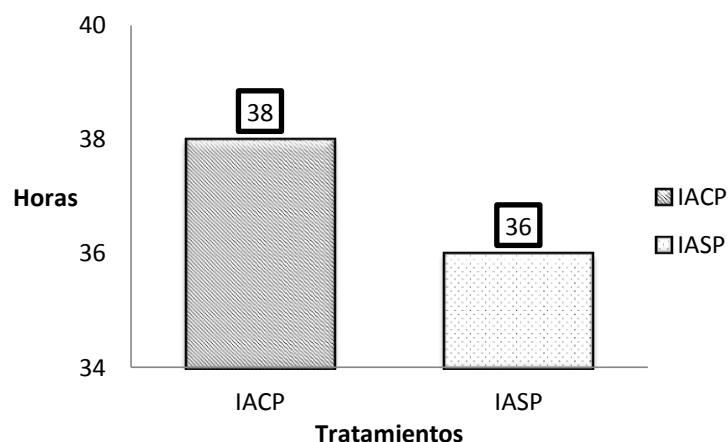


**Figura 1.** Programa reproductivo y de manejo durante el periodo experimental.

## IV.-RESULTADOS

### 4.1 Inicio del estro

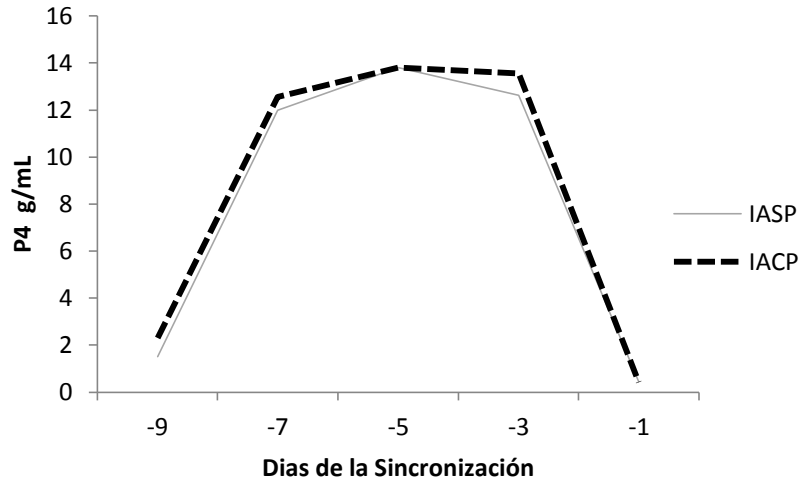
No se observaron diferencias ( $P>0,05$ ) en el porcentaje de animales que presentaron estros, registrándose 100% de estros para los ambos grupos experimentales (IACP:  $38 \pm 4,25$  h; IASP:  $36 \pm 3,03$  h), (figura 2).



**Figura 2.** Tiempo de presentación de estros en ovejas primaras sincronizadas con un protocolo a base de progestágeno más la aplicación de una prostaglandina. IACP= Inseminación Artificial +  $P_4$ ; IASP= Inseminación Artificial Sin Aporte de  $P_4$ .

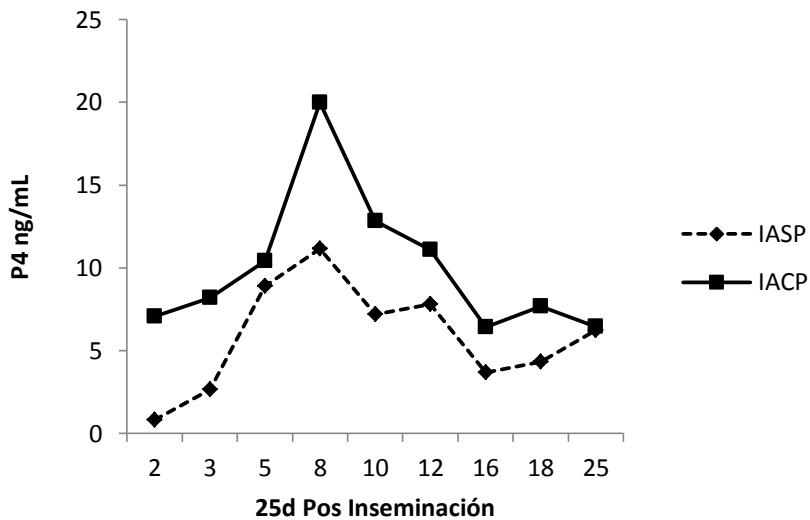
### 4.2 Concentraciones de $P_4$ durante la sincronización de estros

No se observaron diferencias ( $P>0,05$ ) en las concentraciones de  $P_4$  en los animales de ambos grupos durante la sincronización realizada por 9 días previo a la inseminación artificial y al aporte exógeno de progesterona. Ambos grupos mostraron homogeneidad en sus concentraciones durante la sincronización previa a la inseminación artificial (figura 3).



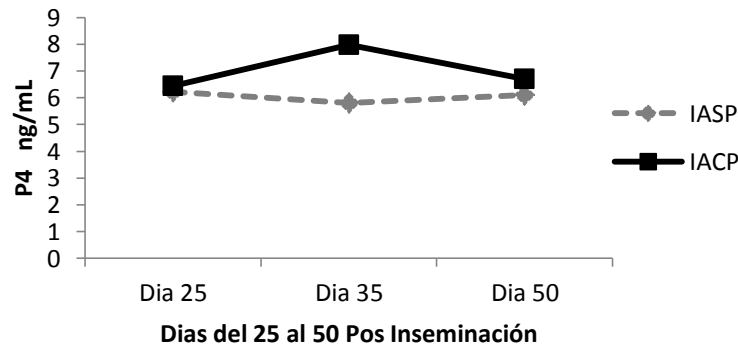
**Figura 3.** Concentración de progesterona (ng/mL) durante la sincronización de estro. IACP= Inseminación Artificial + P<sub>4</sub>; IASP= Inseminación Artificial Sin Aporte de P<sub>4</sub>

Las concentraciones de progesterona para el grupo IACP fueron mayores ( $P < 0.05$ ) durante los primeros 25 d pos inseminación, excepto en los días 5 y 25 en los cuales no hubo diferencia, comparadas con aquellas ovejas que no recibieron el aporte exógeno de P<sub>4</sub> (figura 4).



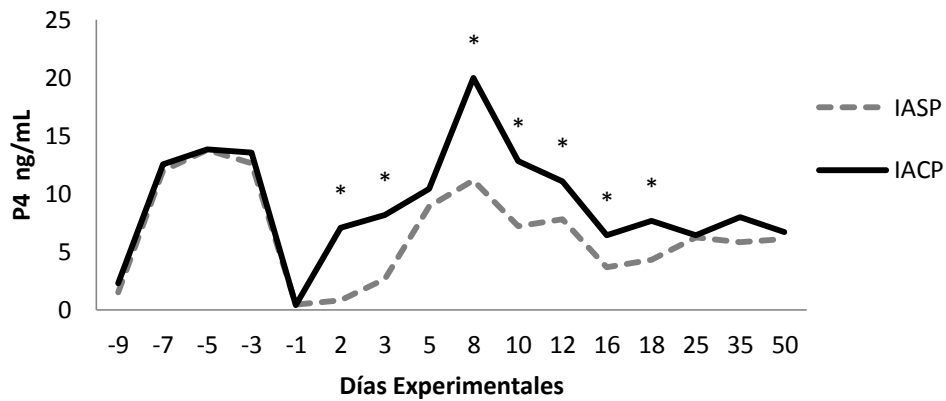
**Figura 4.** Concentraciones de progesterona durante los primeros 25 días pos inseminación. IACP= Inseminación Artificial + P<sub>4</sub>; IASP= Inseminación Artificial Sin Aporte de P<sub>4</sub>.

Del día 25 al 50 las concentraciones promedio de P<sub>4</sub> en ambos grupos se mantuvieron paralelas y estables, no existiendo diferencias (P>0.05), como se presenta en la figura 5.



**Figura 5.** Concentraciones de progesterona (ng/mL<sup>-1</sup>) de los días 25 al 50, posteriores a la inseminación artificial. IACP= Inseminación Artificial + P<sub>4</sub>; IASP= Inseminación Artificial Sin Aporte de P<sub>4</sub>

En la figura 6 se presenta el perfil de progesterona durante todo el período experimental, los asteriscos indican los días que éstas fueron diferentes.



**Figura 6.** Concentraciones de progesterona del día 25 al 50 pos inseminación en ovejas de ambos grupos. IACP= Inseminación Artificial + P<sub>4</sub>; IASP= Inseminación Artificial Sin Aporte de P<sub>4</sub>. \* P<0.05

### 4.3 Diagnóstico de gestación al día 25

En el diagnóstico de gestación a los 25 d, no se observaron diferencias ( $P > 0,05$ ) para las ovejas que recibieron el aporte exógeno de  $P_4$  (IACP: 60 %) respecto al grupo sin  $P_4$  (IASP: 55 %) cuadro 1.

**Cuadro 1.** Porcentajes de gestación a los días 25, 35 y 50 en ovejas primaras con aporte de progesterona (IACP) y sin aporte de  $P_4$  (IASP)

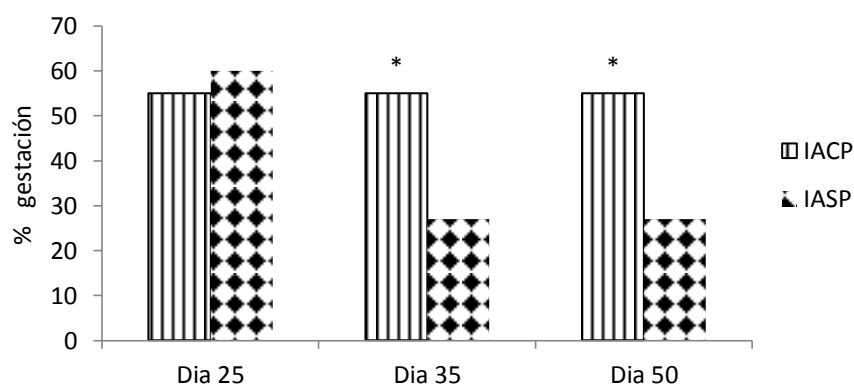
Grupo	Número de animales	Peso Kg $\pm$ EE	Condición		% de Gestación		
			Corporal	Animales	25d	35d	50d
IACP	20	39 $\pm$ 5.2	2.5	11	55	55 <sup>a</sup>	55 <sup>a</sup>
IASP	20	42 $\pm$ 4.5	2.5	12	60	25 <sup>b</sup>	25 <sup>b</sup>

Diferentes letras a, b entre hileras indica diferencia ( $p < 0.05$ ).

IACP= Inseminación Artificial +  $P_4$ ; IASP= Inseminación Artificial Sin Aporte de  $P_4$

### 4.4 Diagnóstico de gestación en los días 35 y 50

Posterior al retiro del aporte exógeno de  $P_4$  mediante el CIDR (35 d) se comprobó el diagnóstico de gestación, el cual fue diferente ( $P < 0.05$ ), disminuyendo a 25 % en el grupo IASP, comparado con el grupo que tenía aporte adicional de  $P_4$  (IACP: 55%), (figura 5).



**Figura 7.** Porcentaje de gestación ambos grupos a los días 25, 35 y 50 post IA. IACP= Inseminación Artificial +  $P_4$ ; IASP= Inseminación Artificial Sin Aporte de  $P_4$ . \*  $P < 0.05$ .



## V.-DISCUSION

Es obvio que ambos grupos estaban sincronizados desde el inicio de los tratamientos, para la Inseminación Artificial, sin embargo consideramos pertinente mencionar los datos de presentación de estro, así como concentración de  $P_4$  durante la sincronización. Los resultados observados en el inicio del estro no mostraron diferencias entre grupos, presentándose en promedio a las  $38 \pm 4,25$  h en el tratamiento IACP; y a las  $36 \pm 3,03$  h en el grupo IASP, después del retiro de los CIDR, lo cual coincide con lo reportado con Lozano *et al.* (2003) y Cordeiro *et al.* (2003), quienes reportaron un inicio aproximado a las 36 horas después del retiro de los análogos de progesterona.

La concentraciones de  $P_4$  durante la sincronización del estro aumentan la posibilidad de mejorar la calidad del desarrollo embrionario, viabilidad y sobrevivencia del mismo, estos incrementos aumentan la presencia de receptores específicos de  $P_4$  y estimulan la presencia de diversos factores de crecimiento que son necesarios para la sobrevivencia del embrión, Spencer y Bazer (2004) hacen evidente la importancia de estos receptores y las variaciones que ocasionan, durante el ciclo estral y durante el establecimiento y mantenimiento de la gestación. En el presente trabajo, ambos tratamientos presentaron concentraciones de  $P_4$  similares durante la sincronización del estro, por lo que en teoría tendrían la misma posibilidad de tener las condiciones uterinas adecuadas para el mantenimiento de la gestación.

Se esperaba un incremento de las concentraciones de  $P_4$  en el grupo que recibió el aporte exógeno, sin embargo el grupo que no lo recibió se mantuvo en niveles

normales (3-6 ng/mL) de animales reportados gestantes durante los primeros 50 días de gestación.

En el grupo tratado con progesterona exógena IACP durante los primeros 25 d pos-inseminación artificial, las concentraciones de  $P_4$  en plasma fueron mayores hasta el día 18 (interacción tratamiento x día  $P < 0.05$ ; Figura 4) excepto para los días 5 y 25 donde no hubo diferencia. El patrón de secreción en las concentraciones de  $P_4$  en plasma, coincide con las obtenidas por Sarda *et al.* (1973), en las cuales el comportamiento fue similar. Se especula que la disminución de los niveles de  $P_4$  alrededor del día 10 probablemente sea ocasionado por el efecto de regulación a la baja de los receptores a progesterona (PR) que permitió que los receptores de  $\alpha$  estradiol ( $ER\alpha$ ) y en consecuencia los receptores a oxitocina (OTR) se incrementaran en los días 13 y 14 iniciando el proceso luteolítico debido a la liberación de pulsos de prostaglandinas ( $PGF_{2\alpha}$ ) por los epitelios luminal y glandular del útero con la consecuente caída de los niveles de  $P_4$  en esos días (Hixon y Flint, 1987; Spencer *et al.*, 1995a; Spencer *et al.*, 1995b).

Es interesante observar que aun cuando los niveles circulantes de progesterona disminuyen durante este tiempo, después del día 16 los niveles de  $P_4$  para ambos grupos se estabilizan y siguen un patrón de comportamiento paralelo, seguramente como señal de la máxima producción del interferon-tau (Roberts *et al.*, 1999); el cual previene el desarrollo del mecanismo luteolítico endometrial suprimiendo la producción de receptores  $\alpha$  estradiol y oxitocina y probablemente logrando estabilizar la producción de progesterona por el cuerpo lúteo (Spencer *et al.*, 1996; Fleming *et al.*, 2001), como se observa a partir de los días 16 al 25 (figura 4) y de los días 25 al 50; (figura 5) donde

los niveles de progesterona en ambos grupos se mantuvieron paralelos y estables sin diferencias significativas durante este periodo.

Aunque las concentraciones de  $P_4$  fueron mayores ( $P < 0.05$ ) en el grupo IACP durante los primeros 25 días pos inseminación, no aumentaron los porcentajes de gestación, periodo en el cual el mantenimiento de una secreción adecuada de progesterona es importante, por la necesidad que existe de la presencia de esta hormona para favorecer una serie de eventos que involucran la quiescencia del ambiente uterino favorezca el desarrollo embrionario del blastocisto (Keyes y Wiltbank, 1988).

Los porcentajes de gestación al día 25 en ovejas pos-I.A. fueron altos considerando que la fertilidad es disminuida en ovejas primaras, asociada a la edad reproductiva y a una tasa baja de fertilidad, que puede ser ocasionada por ciclos cortos y secreciones hormonales anormales, Diskin y Sreenan (1980) reportan que la fertilización en rumiantes después de la IA supera el 80%, sin embargo la tasa de supervivencia embrionaria disminuye hasta 56% en la semanas posteriores, observándose este comportamiento en las ovejas del grupo IASP en el presente experimento, que disminuyeron su porcentaje de gestación al culminar la séptima semana (día 35) existiendo una relación negativa con la disminución de  $P_4$ . Spencer *et al.* (2004), menciona un relacion positiva de la fertilidad con mayores niveles de  $P_4$ , ya que estos son esenciales para la implantación y desarrollo embrionario, observandose el efecto esperado al 2do diagnóstico de gestación (día 35).

En las ovejas que no resultaron gestantes al primer diagnóstico de gestación (día 25) y que se les dió seguimiento hormonal durante el mismo periodo se encontró que sus

concentraciones de  $P_4$  fueron anormales mostrándose incrementos y decrementos en periodos muy cortos, pudiendo estos ser causados por una función lútea subnormal, la cual está asociada con problemas de fertilidad e incapacidad para mantener una gestación (Garverick y Smith, 1986).

En hembras que no lograron la gestación en ambos grupos, la disminución de la concentración de  $P_4$  coincide con la regresión lútea natural alrededor del día 16, a este respecto, Kendall (1981) afirma que hay una liberación pulsátil de prostaglandinas que ocasionan dicha regresión e impiden al embrión darle mas tiempo para mandar la señal adecuada para evitar una cascada de eventos que terminan por desplazarlo, lo que en este caso pudo haber ocurrido; aunque esto puede pasar de manera natural no es el unico factor incluyente, ya que el grupo tratado con aporte exógeno de  $P_4$  (IACP) se comportó de la misma manera y pudo haber acelerado su metabolismo y así disminuir la concentración de  $P_4$  a nivel sistémico, lo que ocasionó la pérdida de los embriones antes del día 25.

Para ambos grupos y en la mayoría de los casos durante el periodo natural que conlleva la regresión lútea alrededor del día 16, las ovejas que mostraron una secreción mayor de progesterona de manera continua y que previamente fueron fertilizadas, lograron mantenerla la gestación hasta el día 25, en donde se observó la sobrevivencia del embrión, concordando con Mann y Lamming (1999) quienes mencionan que la progesterona puede mantener la gestación mediante la estimulación de la secreción de bIFN-t (interferón Tau Bovino), y que las vacas con mayores concentraciones de progesterona durante el periodo critico para el reconocimiento de la gestación presentan mayores porcentajes de concepción.

En el presente estudio se observó una reducción en el porcentaje de gestación en el grupo sin P<sub>4</sub> exogena (IASP: 25%) comparado con el presentado en el grupo con aporte exógeno de P<sub>4</sub> (IACP: 55%) observando una disminución en las que no lo tuvieron, reduciendo las gestaciones hasta en un 50%. Altas tasas de gestación han sido asociadas a un incremento en las concentraciones de progesterona en plasma durante la fase lutea y después de la inseminación (Maurer y Etchernkamp, 1982; Butler *et al.*, 1996; Kerbler *et al.*, 1997).

Las concentraciones bajas de progesterona pueden llegar a conducir a concentraciones excesivas de hormonas, como las hormonas luteolíticas que pueden causar la muerte del embrión (Keyes y Wiltbank, 1988) de ahí la importancia que en algunas ovejas primaras en las cuales sus ciclos reproductivo apenas comienzan con una regulación autónoma hormonal, los niveles séricos de P<sub>4</sub> sean mínimos y requieran ese aporte hormonal exógeno.

El mantenimiento de una secreción adecuada de progesterona es importante, por la necesidad que existe de la presencia de esta hormona para favorecer la implantación del blastocisto; después de la implantación, la secreción de progesterona es esencial para mantener al útero quiescente y con un ambiente que favorezca el desarrollo embrionario continuo (Keyes y Wiltbank, 1988) de ahí la importancia que los niveles de progesterona sean elevados en los primeros 35 días pos-I.A. para dar oportunidad al embrión de que ocurra dicho evento.

Está bien establecido que la progesterona juega un papel importante en la estimulación de la producción de una variedad de secreciones endometriales necesarias para el

desarrollo exitoso del embrión (Geisert *et al.*, 1992). La importancia del incremento en los niveles de progesterona materna es necesaria para los procesos futuros en el desarrollo del concepto y éxito en la gestación.

En hembras que no lograron la gestación, la liberación pulsátil de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  uterina inicia alrededor del día 16 (Kendall, 1981) y es la responsable de la regresión lutea, por lo que la reducción natural de progesterona coincide de manera tal que si el embrión no ha logrado mandar la señal indicada de su presencia, esta cascada de eventos terminan por desplazarlo y así terminar la gestación e iniciar el siguiente ciclo reproductivo de la hembra.

El tratamiento con el aporte de progesterona no mejoró la fertilidad del hato en general previo al día 25, pero sí influyó positivamente en el mantenimiento de la gestación hasta el día 35, ya que el grupo de ovejas sin aporte de  $\text{P}_4$  redujo el porcentaje de gestación dramáticamente hasta en un 50%, quedando con 25 % de gestación. Estos altos porcentajes de pérdidas embrionarias, se deben fundamentalmente a que el embrión no alcanza a enviar el mensaje de inhibir el factor luteolítico  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y para producir suficiente cantidad de progesterona autónoma de la oveja (Córdova y Pérez, 2002).

## **VI.- CONCLUSIONES**

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye que:

Los porcentajes de gestación obtenidos al primer diagnóstico de gestación al día 25 no son diferentes.

Los porcentajes de gestación obtenidos al día 35 pos-inseminación demuestran el efecto benéfico de la  $P_4$  en la supervivencia del embrión.

El aporte exógeno de  $P_4$  (grupo IACP) estimula la implantación y desarrollo del embrión ya que permite una serie de eventos que favorecen su supervivencia en comparación con aquellas ovejas (grupo IASP) que solo dependen de sus niveles autónomos.

## VII.-REFERENCIAS

- Adashi, Y.E., C.E. Resnick, A.J. D'ércole, M.E. Svodoba and J.J. Van Wyk. 1985. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr. Rev.* 6: 400-420.
- Baird, T.D., I.A. Swantson and A.S. McNeilly. 1981. Relationship between LH, FSH and prolactin secretion and the secretion of androgens by the preovulatory follicle in the ewe. *Biol. Reprod.* 24: 1013-1062.
- Bavera, G. A. 2007. Sitio argentino de producción animal, ovina-caprina. Facultad de agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Rio Cuarto, provincia de Córdoba, Argentina. [http://www.produccion-animal.com.ar/producción\\_ovina/producción\\_ovina.htm](http://www.produccion-animal.com.ar/producción_ovina/producción_ovina.htm).
- Bazer, F.W. 1992. Mediators of maternal recognition of pregnancy in mammals. *P. Soc. Exp. Biol. Med.* 199: 373- 384.
- Bearden, H.J., and J.W. Fuquay. 1984. *Applied Animal Reproduction*. 2<sup>nd</sup> Edition. Preston Publishing Company, Inc. A Prentice-Hall Professional Technical, Virginia. 4560 p.
- Bellenda, Omar G. 2003. La ecografía aplicada a la reproducción en especies de interés productivo, Montevideo – Uruguay. <http://www.ecografiavet.com>.
- Binelli, M., P. Subramaniam, T. Diaz, G. Johnson and T. R Hansen. 2001. Bovine interferon-t stimulates the janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway in bovine endometrial epithelial cells. *Biol. Reprod.* 64: 654-665.
- Bowen, J.A., and J. S. Hunt. 2001. The role of Integrins in Reproduction. *P. Soc. Exp. Biol. Med.* 223: 331-343.



- Boyd J.S., S. N., Omran and T. R. Ayliffe. 1988. Use of a high frequency transducer with real time B-mode ultrasound scanning to identify early pregnancy in cows. *Vet. Rec.* (1) 121: 8-11.
- Brenner, R. M., O. D. Slaydon, T. Koji, M. Izumi, M. Chedid, K. G. Csaky and J.S. Rubin. 1997. Hormonal regulation of the paracrine growth factors HGF and KGF in the endometrium of the rhesus macaque. In: Stock G, Habenicht U.F. (eds). *The endometrium as a target for contraception*. Berlin: Springer-Verlag 21-49.
- Burghardt, R.C., G. A. Johnson, L. A. Jaeger, H. Ka, J. E. Garlow, T. E. Spencer and F. W. Bazer. 2002. Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cells. Tissue. Organs.* 172: 202-217.
- Butler, W.T, A. L. Ridall and M. D. McKee. 1996. Osteopontin. In: Bilezikian J.P, Raisz L.G, Rodan G.A (ed), *Principals of Bone Biology*, Academic Press, Inc., New York, pp 167-181.
- Callejas, S. 2001. Fisiología del Ciclo Estral Bovino. En: Palma G, editor. *Biotechnología de la reproducción*. Buenos Aires (Argentina): Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA.
- Caraty A. and D. Skinner. 1999. Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology.* 140: 1-6.
- Caraty A. and B. Delaleux. 2001. The neuronal control of ovulation in the ewe: Dynamics of steroid regulation of GnRH secretion during the estrous cycle. *Memoria. II Curso Internacional. Fisiología de la reproducción en rumiantes*. Colegio de Posgraduados. Montecillo. pp. 137-154.
- Castonguay, F., J.J. Dufour, F. Minvielle. 1990. Follicular dynamics and dominance in Boorola x Finnish Landrace and Boorola x Suffolk ewes heterozygous for the F gene. *J. Reprod. Fert.* 89:193-203.

Catena, M. 2003. Fallas reproductivas durante la gestación temprana. Principales patógenos de la reproducción. Área de Enfermedades Infecciosas. Dpto. SAMP.Fac. de Cs. Vet.

<http://www.vet.unicen.edu.ar/html/sitio%20EdCont/entornovirtual/Ano%20I/2010/2%20Fallas%20Reproductivas%20-%20Catena.pdf>

Chaffaux, S. 1982. Evolution de l'Image Échographique de produit de conception chez la vache. Bull. Acad. Vet. Fr. 55: 213-221.

Chen, C., T. E Spencer and F. W. Bazer. 2000. Fibroblast growth factor-10: A stromal mediator of epithelial function in the uterus and conceptus. Biol. Reprod. 63: 959-966.

Choi, Y., G. A. Johnson, R. C. Burghardt, L. C. Berghman, M. M. Joyce, K. M. Taylor, M. D. Stewart, F. W. Bazer, and T. E. Spencer. 2001. Interferon regulatory factor two restricts expression of interferon-stimulated genes to the endometrial stroma and glandular epithelium of the ovineuterus. Biol. Reprod. 65: 1038-1049.

Coleman, D.A., and R. A. Dailey. 1983. Effects of repeated removal of large ovarian follicles and treatment with progestin on ovarian function in the ewe. Biol. Reprod. 29: 586-593.

Committee on Reproductive Nomenclature. 1972. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. Cornell Veterinarian Pract. 62: 216-237.

Cordeiro, M.F., E. S. Lima-Verde, D. I. A. Lopez Junior, L. N. Texeira, H. O Farias, A. A. Salles, J. B. Simplicio, D. Rondina and V. F. J. Freitas. 2003. Embryo recovery rate in santa ines ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. Small. Rum. Res. 49:19-23.

Córdova I. A. and G. J. F. Pérez. 2002. Indicadores reproductivos de bovinos en el trópico mexicano y factores que los determinan. Med. Vet. 19: 316-335.

Cottle, D. J. 1991. Australian Sheep and Wool Handbook. Inkata Press Melbourne. Australian. pp: 357-362.

- Cullinan-Bove K. and R. Koos. 1993. Vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology*. 133: 829-837.
- Curran, S., R. A. Pierson, and O. G. Ginther. 1986. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 10 through 20. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189: 1289-1294.
- Díaz F.H, A. Hernández., A. G. 1986. Morfología endometrial y niveles de P4 en el tejido uterino durante el ciclo estral de vacas cebú. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 39: 15-27.
- Díaz F.J, L. E. Anderson, Y.L. Wu, A. Rabot, S. J. Tsai and M. C. Wiltbank. 2002. Regulation of progesterone and prostaglandin F<sub>2α</sub> production in the CL. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191: 65-80.
- Diskin, M. G. and J. M. Sreenan. 1980. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *J. Reprod. Fertil.* 59: 463-468.
- Dizerega, G. S. and G. D. Hodgen. 1981. Luteal-phase dysfunction infertility. *Fertil. Steril.* 35: 489-499.
- Downey, B.R. 1980. Regulation of the estrous cycle in domestic animals: A review. *Can. Vet. J.* 21: 301-306.
- Driancourt, A.M. and R. C. Fry. 1988. Differentiation of ovulatory follicles in sheep. *J. Anim. Sci.* 66 (suppl. 2): 9-20.
- Driancourt, M.A., W. W. Thatcher, M. Terqui, and D. Adrieu. 1991. Dynamics of ovarian follicular development in cattle during the estrous cycle, early pregnancy and in response to PMSG. *Domestic. Anim. Endocrin.* 8: 209-221.
- Edward, R.G. 1974. Follicular fluid. *J. Reprod. Fert.* 37: 189-219
- Enders, A.C. 1973. Cytology of the corpus luteum. *Biol. Reprod.* 8: 158–182.

- Evans, A.C., O. G. Adams, and N. C. Rawling. 1995. Endocrine and ovarian changes leading up to the first ovulation in prepuberal heifers. *J. Reprod. Fert.* 100: 187-194.
- Fink, G. 1988. Gonadotropin secretion and its control. In: Knobil, E. and J. Neill (ed.) *The physiology of reproduction*. Ed. New York, Raven Press. 160-182.
- Fleming J.A, Y. Choi, G. A. Johnson, T. E. Spencer and F. W. Bazer. 2001: Cloning of the ovine estrogen receptor-alpha promoter and functional regulation by ovine interferon-tau. *Endocrinology*. 142: 2879-2887.
- Frandsen, R. D. 1988. *Anatomia y fisiología de animales domésticos. Aspectos fisiológicos de la reproducción de la hembra*. Cuarta edición. McGraw-will. México. Pp. 379-389.
- Fricke, P. M., D. Z. Caraviello, K. A. Weigel, and M. L. Welle. 2002. Fertility of dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals following first timed insemination. *J. Dairy. Sci.* 86: 3941–3950.
- Galina C., J.Valencia. 2006. *Reproducción de animales domésticos*. 2<sup>a</sup> ed. Ed. Limusa. México.
- Garcia E. 1988 *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen*. Instituto de Geografía, UNAM. México DF. P 246.
- Garrett J. E., R. D. Geisert, M. T. Zavy and G. L. Morgan. 1988. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J. Reprod. Fert.* 84: 437-446.
- Garverick, A.H. and M.T. Smith. 1986. Mechanisms associated with subnormal luteal function. *J. Anim. Sci.* 62 (suppl. 2): 92.
- Geisert, A. B. Kulkarni, C. G. Huh, D. Becker, M. Lyght and K. C. Flanders. 1992. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *J Pathol.* vol. 90. 770–774.

- Ginther, O.J., L. Knopf, and J.P. Kastelic. 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular. *J Reprod Fertil* 87: 223-230
- Goldring N.B, J. M. Durica, J. Lifka, L. Hedin, S. I. Ratoosh, W. I. Miller, J. Orly and J. S. Richards. 1987. Cholesterol side-chain cleavage P450 messenger ribonucleic acid: evidence for hormonal regulation in rat ovarian follicles and constitutive expression in corpora lutea. *Endocrinology*. 120:1942–1950.
- Goodman, R.L. and F.J. Karsh. 1980. Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology*. 107: 1286-1290.
- Goodman, R.L. 1994. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: Knobil, (ed) *The Physiology of Reproduction* ed. New York Edition, Raven Press. 660-693.
- Gray, C.A, K.M. Taylor, W.S. Ramsey, J.R. Hill, F.W. Bazer, F.F. Bartol & T.E. Spencer. 2001. Endometrial glands are required for pre-implantation conceptus elongation and survival. *Biol. Reprod*. 64: 1608-1613.
- Hadley, M.E. *Endocrinology*. Second Edition. Englewoods Cliff, NJ: Prentice Hall, 1988.
- Hafez, E.S.E. 1987. Anatomía del aparato reproductor femenino. In: *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. (Ed.) E.S.E. Hafez: Interamericana-Mc Graw-Hill. México D.F.
- Hafez, E.S.E. and B. Hafez. 2002. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7<sup>a</sup> ed. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana.
- Hansen, T.R., K. J. Austin, D. Y. Perry, J. K. Pru, M. G. Teixeira and G. A. Johnson. 1999. Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. *J Reprod. Fertil. Suppl*. 54: 329-339.
- Hansen, P.J. 2002. Embryonic mortality in cattle from the embryos perspective. *J. Anim. Sci*. 80 Suppl: 33-44.

- Hauger, R.L., F. J. Karsch, and D. L. Foster. 1977. A new concept for control of the estrous cycle of the ewe based on the temporal relationships between luteinizing hormone, estradiol and progesterone in peripheral serum and evidence that progesterone inhibits tonic LH secretion. *Endocrinology*. 101: 807-817.
- Hernández, A. 1995. *Lecturas sobre reproducción bovina. Tomo III. Aspectos morfofisiológicos de la implantación*. Bogotá, Colombia: Universidad nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Hixon, J. E. and A. P. Flint. 1987. Effects of luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations phosphoinositide turnover and prostaglandin F-2 alpha secretion in sheep. *J. Reprod. Fert.* 79: 457-467.
- [Humblot](#), P. 2001. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Anim. Reprod, Sci.* 61: 131–143.
- Ing., N.H, H. Francis, J.J. McDonnell, J.F. Amann and R. M. Roberts. 1989. Progesterone induction of the uterine milk proteins: major secretory proteins of sheep endometrium. *Biol. Reprod.* 41: 643-654.
- Inskeep, E.K., 2002. Factors that affect embryonic survival in the cow: application of technology to improve calf crop. In: Fields, M.J., Sand, R.S., Yelich, J.Y. (Eds.), *Factors Affecting Calf Crop: Biotechnology of Reproduction*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 255–275.
- Johnson, K. S. and M. F. Smith. 1985. Effects of charcoal-extracted, bovine follicular fluid on gonadotropin concentrations, the onset of estrus and luteal function in heifers. *J. Anim. Sci.* 61: 203-270.
- Johnson, G. A., T. E. Spencer, R. C. Burghardt, K. M. Taylor, C. A. Gray, F. W. Bazer. 2000. Progesterone modulation of osteopontin gene expression in the ovine uterus. *Biol. Reprod.* 62: 1315-1321.

- Johnson, G. A., J.A. Gray, M. D. Stewart, Y. Choi, C.A. Gray, R. C. Burghardt, L. Y. Yu-Lee, J. Chebath, F..W. Bazer & T. E. Spencer. 2001. Effects of the estrous cycle, pregnancy and interferon tau on 2',5'-oligoadenylate synthetase expression in the ovine uterus. *Biol. Reprod.* 64: 1392-1399.
- Karsh, F. J. 1984. The hypothalamus and anterior pituitary gland. In: Austin and Short (editors), *Reproduction in mammals*. Vol. 3. Hormones and reproduction. Cambr. Univ. Press. pp 1-20.
- Karsh, F.J., J.M. Bowen, A. Caraty, N. P. Evans and S. M. Moenter. 1997. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol. Reprod.* 56: 303-309.
- Kassam, A. 1987. Clinical and endocrine responses to embrionic and fetal death induced by manual brupture of the amniotic vesicle during early pregnancy in cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191:417-420.
- Kastelic, J. P., D. R. Bergfelt, O. J. Ginther. 1991. Ultrasonic detection of the conceptus and characterization of intrauterine fluid on days 10 to 22 in heifers. *Theriogenology.* 35: 569-581.
- Kaynard A.H, L. M. Periman, J. Simard, M. H. Melner. 1992. Ovarian 3-hydroxysteroid dehydrogenase and sulfated glycoprotein-2 gene expression are differentially regulated by the induction of ovulation, pseudopregnancy, and luteolysis in the immature rat. *Endocrinology.* 130: 2192–2200.
- Kayser, J.P.R., J. G Kim, R. L. Cerny and J. Vallet. 2006. Global characterization of porcine intrauterine proteins during early pregnancy. *Reproduction.* 132: 379-388.
- Kendall, J. M. 1981 Progesterone, Prostaglandin F2 alpha, PMSG, and estrone sulfate during early pregnancy in mares. *J. Reprod..Fert. (suppl)* 32: 353-354.
- Kerbler, T.L., M. M. Buhr, L. T. Jordan, K. E. Leslie, and J. S. Walton. 1997. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology.* 47: 703-414.

- Keyes, L.P. and M. C. Wiltbank. 1988. Endocrine regulation of the corpus luteum. *Ann. Rev. Physiol.* 50: 465-482.
- [Kinder](#), J. E., [C. M. McDowell](#), L. H. [Anderson](#) and M. L. [Day](#). 1998. Duration of treatment with progesterone and regression of persistent ovarian follicles in cattle. *J. Anim. Sci.* 76: 850-855.
- King, W.A., 1990. Chromosome abnormalities and pregnancy failure in domestic animals. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 34: 229–250.
- Lessey, B.A., Y. Yeh, A. J. Castelbaum, M. A. Fritz. 1996. Endometrial progesterone receptors and markers of uterine receptivity in the window of implantation. *Fertil. Steril.* 65: 477-83.
- Lozano, J.M, P. Lonergan Boland, and D. O. Callagan. 2003. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction.* 125: 543-553.
- Macedo R. and Alvarado A. 2005. Efecto de la época de monta sobre la productividad de ovejas Pelibuey bajo dos sistemas de alimentación en Colima, México. *Archivos de Zootecnia.* 54: 51-62.
- Mamane, Y., C. Heylbroeck, P. Genin, M. Algarte, M. J. Servant, C. LePage, DeLuca, C. Kwon, H. Lin, and J. Hiscott. 1999. Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene.* 237: 1-14.
- Mann, G.E. and G. E. Lamming. 1999. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod. Dom Anim.* 34: 269–274.
- Martel, C., C. Labrie, E. Dupont, J. Couet, C. Trudel, E. Rheaume, J. Simard, Luu-The V., G. Pelletier and F. Labrie. 1990. Regulation of 3-hydroxysteroid dehydrogenase 5-4 isomerase expression and activity in the hypophysectomized rat ovary: interactions between the stimulatory effect of human chorionic gonadotropin and the luteolytic effect of prolactin. *Endocrinology.* 127: 2726–2737.



- Matton, P., V. Adlakov, Y. Couture and J. L. Dufour. 1981. Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 52: 813-820.
- Maurer, R.R and S. E. Echterkamp. 1982. Hormonal asynchrony and development. *Theriogenology*. 17: 11-22.
- McCracken, J.A., W. Schramm and W. C. Okulicz. 1984. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF<sub>2</sub> $\alpha$  from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 7 (1): 31-55.
- McDonald L. M., L. N. Nichols, S. H. McNutt. 1952. Studies on corpus luteum ablation and progesterone replacement therapy during pregnancy in the cow. *Am. J. Vet. Res.* 13: 446–451.
- McNeilly, A S, Baird, D. T. 1989. Episodic secretion of inhibin into the ovarian vein during the follicular phase on the estrous cycle in the ewe. *J. Endocrinol.* 122: 287-292.
- Mejia, V.O. 1997. Transferencia de embriones en pequeños rumiantes. *In: Memorias del curso de manejo reproductivo e inseminación artificial en pequeños rumiantes. Facultad de Medicina y Veterinaria Zootecnia. UNAM. México. D.F. México. pp: 79-85.*
- Melliso, E. 2010. Manual de laboratorio de reproducción animal. Practica 05. Lima, Perú.
- Moenter, S.M., A. Caraty, A. Locatelli and F. J. Karsch. 1991. Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. In: Knobil, (ed) *The Physiology of Reproduction* ed. New York Edition, Raven Press. 129: 1175-1182.
- Murdoch, W.J. 1985. Follicular determinants of ovulation in the ewe. *Dom. Anim. Endocrinol.* 2: 105-121.

- Nakamura T., K. Sakamoto. 2001. Reactive oxygen species up-regulates cyclooxygenase-2, p53, and Bax mRNA expression in bovine luteal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284:203-210.
- Niswender, D.G. and T. M. Nett. 1988. The corpus luteum and its control. In: Knobil, E. and J. Neill (ed.). *The physiology of reproduction*. Raven Press. U.S.A. 489 p.
- Ohtani S., K. Okuda. 1995. Histological observation of the endometrium in repeat breeder cows *J. Vet. Med. Sci.* 57: 283-286l.
- Okamura, H., S. I. Yang, K. H. Wright and E. E. Wallach. 1972. The effect of prostaglandin F2 on the corpus luteum of the pregnant rat. An ultrastructural study. *Fertil. Steril.* 23:475-483.
- Olivera, M. 2007. Vías implicadas en la luteólisis bovina. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 20: 387-393.
- Ott, T.L, M. A. Mirando, M. A. Davis and F. W. Bazer. 1992. Effects of ovine conceptus secretory proteins and progesterone on oxytocin-stimulated endometrial production of prostaglandin and turnover of inositol phosphate in ovariectomized ewes. *J. Reprod. Fertil.* 95:19-29.
- Palmer, E., M. A. Driancourt. 1980. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. *Theriogenology.* 13, 203-216.
- Pant, H.C., C. R. N. Hopkinson and R. J. Fitzpatrick. 1977. Concentration of oestradiol, progesterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the jugular venous plasma of ewes during the oestrous cycle. *J. Endocrinol.* 73: 247-255.
- Perkins, T. 2000. Uso del ultrasonido en la clasificación de la canal y evaluación reproductiva. Primer congreso nacional de la raza cebú. *Revista El Cebú.*
- Picazo, R.A. and A. López-Sebastian. 1995. Desarrollo folicular en el ovario de la especie ovina. *Investigación Agraria.* 10: 77-93.

- Pierson, R.A., and J. O. Ginther. 1984. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology*. 21: 495-504.
- Quirke, J.F., J. P Hanrahan & J. P. Gosling. 1979. Plasma progesterone levels throughout the oestrous cycle and release of LH at oestrus in sheep with different ovulation rates. *J. Reprod. Fert.* 55: 37-44.
- Roberts, R. M., A. D. Ealy, A. P Alexenco, C. S. Han Ezashi. 1999. Trophoblast interferon placental. *Biol. Reprod.* 20: 259-264.
- Rothchild, I. 1981. The regulation of the mammalian corpus luteum. *Rec. Progr. Horm. Res.* 37: 183-298.
- Rubin, J. S, D. P Bottaro, M. Chedid, T. Miki, D. Ron, G. Cheon, W. G. Taylor, E. Fortney, H. Sakata, P. W. Finch. 1995. Keratinocyte growth factor. *Cell. Biol. Int.* 19: 399-411.
- Sarda, I.R, H. A. Robertson, T. C. Smeaton. 1973. Secuential changes in plasma progesterone levels in the ewe during estrous cycle and during pregnancy in intact and ovariectemized sheep. *Can J. Anim. Sci.* 53: 25-34.
- SAS. 2002. SAS user´s Guide: Statics. Version 9na. Cary, NC. U.S.A Inst.
- Sekine, K, H. Ohuchi, M. Fujiwara, M. Yamasaki, T. Yoshizawa, T. Sato, N. Yagishita, D. Matsui, Y. Koga, N. Itoh & S. Kato. 1999. FGF10 is essential for limb and lung formation. *Nature Genet.* 21: 138-141.
- Shanks, R.D. and Greiner, M.A. 1992. Relationship between genetic merit of Holstein bulls and deficiency of uridine monophosphate synthase. *J. Dairy Sci.* 75: 2023-2029.
- Sirois, J. and E. Fortune. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39: 290-308.

- Skinner, D. C. and A. E. Herbison. 1997. Effects of photoperiod on estrogen receptor, tyrosine, hydroxylase, neuropeptide Y, and beta endorphin immunoreactivity in the ewe hypothalamus. *Endocrinology*. 138: 2585-2595.
- Skinner, D. C, Harris, T. G. and Evans, N.P. 1998. Duration and amplitude of the luteal phase progesterone increment times the estradiol-induced luteinizing hormone surge in ewes. *Biol. Reprod.* 63: 1135-1142.
- Souza, C. J., B. K. Campbell, R. Webb and D. T. Baird. 1997. Secretion of inhibin A and follicular dynamics throughout the estrous cycle in the sheep with and without the Booroola gene (FecB). *Endocrinology*. 138: 5333-5340.
- Spencer, T. E. and F. W. Bazer. 1995. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrus cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol. Reprod.* 53: 1527-1543.
- Spencer, T. E, W. C. Becker, P. George, M. A. Mirando, T. F. Ogle and F. W. Bazer. 1995a. Ovine interferon-tau inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. *Endocrinology*. 136: 4932-4944.
- Spencer, T. E, W. C. Becker, P. George, M. A. Mirando, T. F. Ogle and F. W. Bazer. 1995b. Ovine interferon-tau regulates expression of endometrial receptors for estrogen and oxytocin but not progesterone. *Biol. Reprod.* 53: 732-745.
- Spencer, T.E, W. Becker, P. George, M. A. Mirando, T. F. Ogle and F. W. Bazer. 1995c. Ovine Interferon Tau inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. *Endocrinology*. 136: 4932-4944.
- Spencer, T. E., T. L. Ott and F. B. Bazer. 1996. Tau interferon: pregnancy recognition signal in ruminants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 213: 215-229.
- Spencer, T.E and F. W. Bazer. 1996. Ovine interferon-tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor in the ovine endometrium. *Endocrinology*. 137: 1144-1147.

- Spencer, T.E. and F. W. Bazer. 2002. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front. Biosci.* 7: 1879-1898.
- Spencer T. E. and Bazer F. W. 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Rep. Biol. Endo.* 2: 1-49.
- Spencer, T.E., G. A. Johnson, R. C. Burghardt and F. W. Bazer. 2004. Progesterone and placental hormone actions on the uterus. *Insights from Dom. Anim. Biol. Reprod.* 71: 2-10.
- Sreenan, J.M. y Diskin. 1980. The extent and timing of embryonic mortality in the cow. *The agriculture institute, Belclare, Tuam, Galway, Ireland.* 58: 39–44
- Stewart, D., G. A. Johnson, C. A. Vyhlidal, C. R. Burghardt, S. H. Safe, Yu-Lee, F. W. Bazer & T. E. Spencer. 2000. Interferon tau activates multiple STAT proteins and has complex effects on interferon-responsive gene transcription in ovine endometrial epithelial cells. *Endocrinology* 142: 98-107.
- Stocco, C. T. 2006. Life and death of the corpus luteum. *Endocrine Reviews.* 28(1):117–149 143.
- Stocco, C. T., C. Telleria and C. Gibori. 2007. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocrine Reviews.* 28 (1): 117-149.
- Sugawara J, T. Fukaya, T. Murakami, H. Yoshida & A. Yajima. 1997. Hepatocyte growth factor stimulate proliferation, migration, and lumen formation of human endometrial epithelial cells in vitro. *Biol. Reprod.* 57: 936-942.
- Suzanne, M., A. Moenter, A. Caraty And F. J. Karsch. 1990. The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology.* 127: 1375-1384.
- Taverne, M. A. M., and A. H. Willemse. 1989. Diagnostic ultrasound and animal reproduction, Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, [36, Issue 3](#). pp. 253-260.

- Thatcher, W. W., A. Guzeloglu, R. Mattos, M. Binelli, T. R. Hansen. 2001. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology*. 56: 1435-1450.
- Tonetta, S.A., G. S. Dizerega. 1989. Intra-uterine regulation of follicular maturation. *Endocr. Rev.* 10: 205–229.
- Uehara, Y., O. Minowa, C. Mori, C. J. Shiota, Kuno, T. Noda & N. Kitamura. 1995. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature*. 373: 702-705.
- Valencia, J. M., J.L Arrollo, J. S. Gallegos, A. Villa Godoy. 2005. Sistemas neurales de retroalimentación durante el ciclo reproductivo anual de la oveja. *Interciencia*. 31(1): 8-15.
- Vanroose G., A. de Kruif, Van Soom. 2000. Embryonic mortality and embryo–pathogen interactions. *Anim. Reprod. Sc.* 60: 131–143.
- Vatti, Giuseppe. 1985. Ginecología y obstetrician veterinarias 3ed. Facultad de veterinaria de la Universidad de napoles. UTEHA.
- Vincent, D. L., S. Meredith, and E. K. Inskeep. 1986. Advancement of uterine secretion of prostaglandin e<sub>2</sub> by treatment with progesterone and transfer of asynchronous embryos. *Endocrinology*. 119: 527-529.
- Wang, B, Goff A. 2003. Interferon- $\gamma$  stimulates secretion of macrophage migration inhibitory factor from bovine endometrial epithelial cell. *Biol. Reprod.* 69: 1690-1696.
- Wang, C.K., R. S. Robinson, A. P. Flint, G. E. Mann. 2007. Quantitative analysis of changes in endometrial gland morphology during bovine oestrus cycle and their association with progesterone levels. *Reproduction*. 134: 365-371.
- Whisnant, C. S. and R. L. Goodman. 1988. Effects of an opioid antagonist on pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe vary with changes in steroid negative feedback. *Biol. Reprod.* 39: 1032-1038.

Zheng, J., P. M. Fricke, L. P. Reynolds, D. A. Redmer. 1994. Evaluation of growth, cell proliferation, and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 51: 623-632.