



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**CONCENTRACIÓN DE ECG Y ACTIVIDAD REPRODUCTIVA
LUEGO DEL ABORTO AL DÍA 70 EN YEGUAS.**

María José Estradé Echeguía

Tesis de Maestría en Salud Animal

**URUGUAY
2016**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**CONCENTRACIÓN DE ECG Y ACTIVIDAD REPRODUCTIVA
LUEGO DEL ABORTO AL DÍA 70 EN YEGUAS**

María José Estradé Echeguía

**Dr. Daniel Cavestany
DMV, MSc, PhD
Director de Tesis**

**Dr. Rodrigo Costa Mattos
DMV, PhD
Co-director**

2016

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Luis Lossino; MV, PhD

Laboratorio de Reproducción Equina

Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Ana Meikle; DMV, MSc, PhD

Laboratorio de Técnicas Nucleares

Facultad de Veterinaria, UdelaR. Montevideo, Uruguay.

Alejo Menchaca; DMV, MSc, PhD

Instituto IRAUy

Montevideo, Uruguay

FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados
ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS
DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

“Concentración de eCG y actividad reproductiva luego del
aborto al día 70 en yeguas ”

Por: Dra. Maria José Estradé Echeguía

Director de Tesis: Dr. Daniel Cavestany
Codirectore de Tesis: Dr. Rodrigo Costa Mattos

Tribunal

Presidente: Dr. Luis Losinno

Segundo Miembro: Dra. Ana Meikle

Tercer Miembro: Dr. Alejo Menchaca

Fallo del Tribunal: *APROBADA CON MENCIÓN*

Salón de Posgrados
Viernes 29 de julio de 2016

INDICE

INDICE	i
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	4
1. LAS COPAS ENDOMETRIALES.....	4
1.1 Origen y formación	4
1.2 Factores reguladores de la formación de la faja coriónica.....	5
1.3 Las copas endometriales maduras.....	5
1.4 Respuesta inmune materna.....	6
1.5 Degradación de las copas endometriales.	7
1.6 Copas endometriales persistentes.....	8
2. EL PRODUCTO DE LAS COPAS ENDOMETRIALES: LA GONADOTROFINA CORIÓNIC EQUINA (eCG).....	9
2.1 Propiedades fisicoquímicas de la eCG	9
2.2 Propiedades biológicas	9
2.3 Dinámica de la eCG	10
2.4 Factores que influyen en la producción de eCG	11
2.5 Funciones de la eCG: Rol luteogénico y luteotrópico	12
2.6 Otras funciones.....	14
2.7 Usos de la hormona en otras especies	15
2.8 eCG en yeguas vacías.....	15
3. INDEPENDENCIA DE LAS COPAS ENDOMETRIALES Y EL CONCEPTO	15
3.1 Dinámica de la eCG luego del aborto.....	15
3.2 Actividad reproductiva luego del aborto en presencia de copas endometriales ...	16
3.3 Concentración de eCG y comportamiento reproductivo	20
4. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA: REPERCUSIONES PRÁCTICAS DE LA BIOLOGÍA DE LAS COPAS ENDOMETRIALES.....	20
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS.....	23
Objetivo General	23

Objetivos específicos	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Local y animales	24
Manejo reproductivo.....	24
Muestras sanguíneas y análisis hormonales.....	25
Análisis de las muestras.....	25
Análisis estadístico	25
RESULTADOS	26
Ovulación.....	27
Concepción	29
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIONES	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

AGRADECIMIENTOS

A quienes contribuyeron a este trabajo: Dr. Daniel Cavestany, Dr. Fernando Perdigón y Dra. Lucy Sosa y su laboratorio, Dra. Ana Meikle y su Laboratorio de Técnicas Nucleares, Dr. Nicolás Cazales, Dr. Jorge Estévez, Dra. María Noel Martínez, Sr. Jorge Rodríguez, Dr. Danilo Fila, Dra. Sandra Fiala y su Laboratorio, y al Br. Nicolas Irrazábal por su ayuda y compañía.

Especialmente al Dr. Rodrigo Mattos, co-tutor de esta maestría por toda la guía y ayuda en lo referente a la parte académica de este trabajo, y en la no académica, siempre dispuesto a dar una mano extra en Porto Alegre, con su constante buen humor y su energía inagotable.

A mi familia, a Gastón, y a mis amigos.

Esta Maestría fue apoyada por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) mediante una beca para Posgrados Nacionales, y por la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) del Ministerio de Educación de Brasil, mediante una beca para movilidad para estudiantes de Posgrado.

A ambas instituciones, mi agradecimiento.

RESUMEN

Nuestro objetivo fue estudiar la relación entre la concentración de eCG al momento del aborto en yeguas y el posterior desempeño reproductivo en la misma temporada. Veintidós yeguas mestizas de tipo Criollo, con edades gestacionales aproximadamente iguales (rango de 70 a 77 días) fueron inducidas a abortar mediante ruptura digital de las membranas fetales. Al momento de la inducción y durante las diez semanas siguientes, se midieron las concentraciones séricas de eCG y se realizó un seguimiento de la actividad reproductiva. La concentración de eCG previo al aborto fue variable entre las yeguas, con una media de 31.7 ± 28.1 UI/ml (rango: 0.81-86.63 UI/ml). La concentración de eCG fue decreciendo y todas las yeguas alcanzaron concentración de 0 UI/ml dentro de los 70 días posteriores al aborto. La mitad de las yeguas que abortaron volvió a ovular luego del aborto, en un promedio de 34.4 ± 9.8 días post aborto (rango 11 a 60). El 90.9% de las yeguas que ovuló, volvió a gestar. Observamos concentraciones umbrales de eCG por debajo de las cuales las yeguas fueron capaces de ovular (2.9 UI/ml) y concebir nuevamente (1.4 UI/ml). La eCG al momento de inducir el aborto fue significativamente menor en las yeguas que ovularon que en las que no ovularon ($p=0.007$), y también fue menor en las yeguas que volvieron a concebir que en las que no lo hicieron ($p=0.002$). Encontramos una correlación positiva ($r^2=0.40$) entre la concentración de eCG al momento del aborto y el intervalo primera gestación-segunda gestación ($p=0.05$). Las tasas de ovulación y gestación están relacionadas con la eCG al momento del aborto. Yeguas con ≤ 35 IU/ml de eCG al aborto tuvieron mayores tasas de ovulación ($p=0.024$) y concepción ($p=0.002$) que yeguas con >35 UI/ml. Ninguna yegua con >35 UI/ml volvió a concebir dentro de los primeros 70 días posteriores al aborto. En conclusión, en yeguas que abortan al día 70, la concentración de eCG puede ayudar a establecer un pronóstico sobre el comportamiento reproductivo para el resto de la temporada.

SUMMARY

The aim of the present experiment was to study the relationship between eCG concentration in mares at and after abortion and the subsequent reproductive activity in the same breeding season. Twenty two mixed breed, Criollo type mares with the same gestational ages (70 to 77 days) were induced to abort by digital puncture of fetal membranes. Immediately before induction, and for the next ten weeks, eCG concentration and reproductive activity were monitored. Pre-abortion eCG was variable, with a mean of 31.7 ± 28.1 IU/ml (range, 0.81-86.63 IU/ml). eCG decreased after abortion and all mares reached 0 IU/ml within the next 70 days. Half of the mares ovulated again after a mean of 34.4 ± 9.8 days post abortion (range, 11-60 days). 90.9% of the mares that ovulated reconceived during the experiment. We observed threshold eCG concentrations below which mares are able to ovulate (2.9 IU/ml) and conceive (1.4 IU/ml). Pre-abortion eCG was significantly lower in mares that ovulated than in those that did not ($P= 0.007$), and lower in mares that re conceived than in mares that did not ($P= 0.002$). The interval from first to second conception was positively correlated with pre abortion eCG concentration ($r^2=0.40$). Ovulatory and pregnancy rates were related to eCG concentration at abortion: mares having ≤ 35 IU/ml had significantly higher ovulation ($P= 0.024$) and pregnancy rates ($P= 0.002$) than mares >35 IU/ml. No mares with >35 IU/ml became pregnant again. In conclusion, in mares aborted around day 70, measuring eCG concentration can help establish a functional prognosis for the same breeding season.

INTRODUCCIÓN

En el Uruguay el sector ecuestre ha experimentado un crecimiento importante en los últimos años. Uruguay es el segundo país del mundo con mayor relación caballos/habitante luego de Mongolia. El sector ecuestre genera 18000 puestos de trabajo directos entre trabajadores de tiempo completo y parcial, y hay 67.000 personas integrantes de núcleos familiares que perciben ingresos derivados de la industria ecuestre por concepto de trabajo directo (Ferrari, 2012). El conocimiento de la medicina y la reproducción por parte de los veterinarios de equinos uruguayos debe acompañar este crecimiento de la industria hípica. El equino va ganando terreno como una especie productiva, y dentro de la producción equina la reproducción es un aspecto fundamental.

Las pérdidas gestacionales representan una pérdida económica para la industria. En la yegua, en general se pierde un 12 % de las preñeces, la mayoría de las cuales son pérdidas embrionarias, que ocurren antes del día 40 de gestación (Morris, 2002). Aunque las pérdidas fetales, luego del día 40, representan menos del 5% del total, hay situaciones en que este porcentaje se vuelve más importante (Zent, 2003), y contextos productivos donde la gestación es interrumpida voluntariamente luego de ese momento. Tradicionalmente se ha descrito que las yeguas que pierden su gestación entre los días 40 y 140, período de actividad de las copas endometriales, no ciclan normalmente luego del aborto y no vuelven a concebir dentro de la misma temporada reproductiva, perdiéndose así un año productivo de la yegua (Jeffcot et al. 1987; Allen, 1994; Allen y Wilsher, 2009; de Mestre et al. 2011).

Las copas endometriales, exclusivas del género *Equus*, son estructuras temporarias derivadas del trofoblasto fetal que se establecen en el útero aproximadamente entre los días 40 a 140 de gestación (Allen et al. 1993). Una vez establecidas, las copas siguen su normal desarrollo aunque la preñez se interrumpa, para desaparecer en el momento en que lo harían si la yegua siguiese preñada (Allen, 1994). La eCG o gonadotrofina coriónica equina es una hormona producida por las copas endometriales, y su función está relacionada teóricamente al mantenimiento de la preñez (Urwin y Allen, 1982). Se ha sugerido que las yeguas que tiene menos eCG al momento del aborto serían las que podrían retornar antes a la ciclicidad normal y volver a concebir en la misma temporada (Allen, 2003).

Recientemente se han publicado reportes de casos en que se reutilizan como receptoras, poco tiempo después del aborto, a yeguas que han sido inducidas a abortar alrededor del día 65, en pleno período de actividad de las copas endometriales (Aguilar et al. 2012, Cuervo Arango et al. 2015). Esto generó una controversia, ya que de acuerdo a lo descrito tradicionalmente, éstas yeguas no ciclarían con normalidad en seguida del aborto. El objetivo de este trabajo es estudiar la relación de la concentración de eCG al aborto y luego de éste, con el desempeño reproductivo de la yegua dentro de la misma temporada.

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

1. LAS COPAS ENDOMETRIALES

1.1 Origen y formación

Al día 25 de la gestación equina comienza a formarse una estructura denominada faja coriónica, que se ve como una franja de color blanco rodeando la circunferencia del concepto, ubicada sobre el lugar en el que toman contacto el alantocorion en crecimiento y el saco vitelino en regresión (de Mestre et al. 2011). Histológicamente la faja está formada por pliegues del trofoblasto, que en esa región tiene sólo una capa de células de espesor (Allen y Wilsher, 2009). Alrededor del día 30 de gestación, las células en las puntas de estos pliegues proliferan rápidamente, dando lugar a proyecciones cuyos extremos se aplanan al tomar contacto con el endometrio (Wooding et al. 2001). Las proyecciones adyacentes, junto con los espacios que quedan entre ellas, conforman estructuras parecidas a glándulas, y secretan una sustancia mucosa que ayudaría a adherir el trofoblasto con el endometrio (Allen, 2003; Allen y Wilsher, 2009). Al día 32, las células de la faja coriónica que hasta ahora proliferaban rápidamente y contaban con un único núcleo, dejan de multiplicarse y se diferencian en células binucleadas incapaces de dividirse, pero capaces de secretar una glicoproteína particular: la eCG o gonadotrofina coriónica equina, hormona específica de la preñez equina (Wooding et al. 2001; de Mestre et al. 2011). Al día 35, la faja coriónica puede verse macroscópicamente como una banda pálida de 1 a 1.5 cm de espesor sobre el límite del alantocorion, que en ese momento ocupa los dos tercios inferiores de la vesícula embrionaria.

Entre los días 35 a 37, la faja entera se desprende del concepto (Allen y Wilsher, 2009). Aproximadamente en el mismo momento, las células hiperplásicas comienzan a migrar desde la faja coriónica, y a invadir el epitelio luminal del endometrio, extendiendo pseudópodos que les permiten pasar entre las células epiteliales, y a veces a través de ellas, destruyéndolas. Atraviesan las glándulas endometriales y sus membranas basales, y se internan en el estroma, rompiendo vasos linfáticos pero respetando los capilares (Allen, 2003). La migración por el estroma dura de 24 a 48 horas, luego de las cuales las células dejan de trasladarse, se agrupan entre sí y se agrandan significativamente, formando las copas endometriales (Allen et al. 1973). Posteriormente el epitelio endometrial vuelve a crecer sobre la superficie de la copa. Estos tres eventos: proliferación, diferenciación a células binucleadas capaces de secretar eCG, y adquisición del fenotipo invasor, se completan en aproximadamente diez días (Antczak et al. 2012).

Desde que se inicia la invasión de células trofoblásticas al útero, se genera una respuesta inmune materna frente a ellas. Linfocitos y otros leucocitos se acumulan en el estroma endometrial alrededor de las células invasoras, las cuales expresan antígenos paternos mediante MHC de clase I (Wilsher y Allen, 2009). Este aspecto será abordado más adelante.

1.2 Factores reguladores de la formación de la faja coriónica

Hay varios factores de crecimiento que se expresan en los tejidos adyacentes a la faja coriónica y que podrían estar implicadas en la regulación de la diferenciación de esta estructura (de Mestre et al. 2011; Antczak et al. 2012).

Uno de estos factores es el factor de crecimiento-expansión hepatocitario (HGF-SF) secretado por el mesodermo alantoideo. Stewart et al. (1995) propusieron que el HGF-SF, altamente mitogénico, estimula la proliferación de las células trofoblásticas que están sobre el alantoides. El trofoblasto en toda su extensión expresa el receptor específico para este factor, llamado receptor c-met. En los sectores en que el trofoblasto está unido firmemente al alantoides, la multiplicación celular hace que las membranas fetales se expandan y el concepto crezca. Pero sobre la zona en que toman contacto el corioalantoides y la membrana coriovitelina, las células trofoblásticas no están unidas a las capas subyacentes, por lo que al multiplicarse se apilan sobre sí mismas y expanden hacia los costados, dando lugar a la faja coriónica. El HGF-SF les confiere además a estas células, un fenotipo invasivo. La teoría de Stewart se vio apoyada con el descubrimiento de que las células de la faja coriónica expresan c-met, el receptor del HGF-SF, y que además secretan metaloproteinasas que son propias de células con fenotipos migratorios. La expresión del factor de crecimiento epidermal (EGF) y del factor de crecimiento transformador (TGF β) aumentan dramáticamente en el epitelio de las glándulas endometriales entre los días 30 y 40 de gestación, cuando las células trofoblásticas adquieren fenotipo invasor. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) también es expresado en el endometrio durante el desarrollo de la faja coriónica. No está claro como actuarían estos factores de crecimiento, pero se ha confirmado la expresión de sus receptores en las células trofoblásticas invasoras.

Hay además varios factores intrínsecos del propio tejido de la faja que promueven su desarrollo, como por ejemplo el VEGF ya mencionado y otros como el GCM1, un factor cuya expresión máxima ocurre alrededor del día 34, y que estaría relacionado con la diferenciación final de las células de las copas endometriales (Antczak et al. 2012).

En un estudio comparando la expresión de genes en el trofoblasto invasor con el trofoblasto no invasor en conceptos equinos de 33 a 34 días, se encontraron diferencia en alrededor de 300 genes. A destacar fue la gran cantidad de transcritos para interleucina 22 (IL22) encontrada en el trofoblasto invasor. La IL22 es una citocina producida por los linfocitos Th17 y TH22 que tiene como tejido diana el epitelio, y se cree que su función sería fomentar la re epitelización del endometrio luego de la invasión del tejido trofoblástico (Brosnahan et al. 2012).

1.3 Las copas endometriales maduras

Macroscópicamente, alrededor de los 50 días de gestación, las copas maduras se ven como placas pálidas y elevadas en la superficie luminal del endometrio, ubicadas en la base del cuerno grávido. Pueden ser placas aisladas, desde 1 o 2 cm de diámetro, o cordones de más de 10 cm de largo (Allen, 2003; Wilsher y Allen, 2009; Antczak et al. 2012). Desde el punto de vista histológico están formadas por una masa de células binucleadas unidas entre sí, con escaso estroma,

rodeadas por algunos vasos sanguíneos y linfáticos. Las glándulas endometriales obstruidas durante la migración del trofoblasto presentan su porción fúndica dilatada por la acumulación de material secretorio rico en carbohidratos (de Mestre et al. 2011).

El tamaño de las copas es altamente variable entre copas y entre yeguas (Allen y Wilsher, 2009; Wilsher y Allen, 2011; Boeta y Zarco, 2012). Hay varias causas propuestas para esta variabilidad.

El tamaño de la faja coriónica del concepto, y por tanto la cantidad de tejido invasor que entra en el endometrio materno es una de ellas. El tamaño de la faja estaría determinado por factores genéticos, y las mayores diferencias de tamaño se evidencian entre conceptos híbridos de diferentes especies de equinos (Boeta y Zarco, 2012; Antczak et al. 2012). Otro factor importante es la forma del endometrio materno al momento de la invasión, cuando éste y el concepto con su faja coriónica están aposicionados. Cuando el endometrio está muy plegado, sólo serán invadidas las puntas de éstos pliegues, y luego, cuando el endometrio se estire por el crecimiento fetal, las copas aparecerán separadas. Por el contrario, si no está plegado, toda la superficie endometrial será invadida dando lugar a copas largas con forma de cordón (Wilsher y Allen, 2011; Antczak et al. 2012).

Un ejemplo de esto es que yeguas que conciben en el celo del potro, en que la involución uterina no está completa, la superficie a invadir es mayor, y por tanto mayores también serán las copas y la producción de eCG (Bell y Bristol, 1991).

1.4 Respuesta inmune materna

Las células de la faja coriónica son de origen fetal, por tanto genotípicamente diferentes a las maternas, y generan una reacción inmunológica cuando ingresan en el endometrio de la yegua. Antes de invadir el endometrio, las células trofoblásticas expresan antígenos tanto de origen materno como paterno mediante moléculas de MHC de clase I, por lo que en seguida de la invasión el endometrio monta una respuesta humoral contra los antígenos paternos (Noronha et al. 2012). Las células invasoras ya diferenciadas pierden la expresión de MHC I en los diez primeros días post invasión, mediante un proceso que parece ser intrínseco de las propias células, pues lo mismo ocurre en células cultivadas in vitro (Antczak et al. 2012). No presentan antígenos mediante MHC II en ningún momento de su existencia (de Mestre et al. 2011).

Al ingresar al endometrio, las células invasoras son rodeadas por células del sistema inmune materno, principalmente linfocitos T CD4+y TCD8+, y linfocitos B. Hay evidencia de actividad NK en algunos de estos linfocitos, pero no se ha explicado su función (Noronha et al. 2012). El número de linfocitos decrece porque gradualmente las células invasoras dejan de presentar moléculas paternas en el MHC I (Wilsher y Allen, 2011). Los linfocitos se ubican luego formando clusters en la periferia de las copa. Alrededor de los días 60 a 70 se agregan neutrófilos, eosinófilos y macrófagos, y la copa comienza a ser infiltrada por todas estas células que atacan activamente a las células invasoras (Allen,2003; de Mestre et al. 2011; Antczak et al. 2012).

1.5 Degradación de las copas endometriales.

Más allá de los días 45 a 50, macroscópicamente las superficie de la copa se vuelve más cóncava, y en la depresión central que se forma se acumula una sustancia pegajosa, con aspecto de miel, y que contiene grandes cantidades de eCG. Esta sustancia está formada por los restos necróticos de la copa, y por la secreción rica en carbohidratos que se había acumulado en las glándulas endometriales, que es liberada cuando las glándulas se van destapando (Allen, 2011; de Mestre et al. 2011; Wilsher y Allen, 2011). Luego de los días 80 a 90, las copas empiezan a volverse más pálidas y de aspecto caseoso. Entre los días 100 y 140 los restos de la copa se desprenden completamente del endometrio dejando una densa banda de leucocitos en el estroma, y una cicatriz lisa en la superficie uterina. El momento en que esto ocurre varía considerablemente entre copas y entre yeguas (Wooding et al. 2001; Antczak et al. 2012). Los restos de la copa, que quedan entre el útero y las membranas fetales, se invaginan dentro de éstas. Pueden verse al momento del parto como pequeños sacos pedunculados en el alantocorion (Allen, 2001; de Mestre et al. 2011; Wilsher y Allen, 2011).

Se pensaba que la degradación de la copa era producto únicamente del ataque del sistema inmune, pero los mecanismos son más complejos. Algunos de los procesos teóricamente implicados se describen a continuación.

La superficie luminal y el tejido del centro de la copa están poco vascularizados, por lo que las células de estas regiones empiezan a llenarse de vacuolas y a degenerar antes que los leucocitos comiencen a acumularse en la periferia (Wilsher y Allen, 2011). Se cree que la vida media de las células de la copa endometrial estaría determinada por factores intrínsecos, que aún no se conocen. En un experimento se cultivaron fragmentos de faja coriónica como explantos. Las células crecieron vigorosamente, y formaron colonias estables de células binucleadas, que secretaron eCG hacia el medio de cultivo por más de 150 días. Esto demostró la capacidad de las células de crecer, diferenciarse, funcionar, y aún morir en ausencia del ambiente uterino (Antczak et al. 2012). Se ha comprobado además que las células de la copa endometrial sobreviven y mantienen su funcionalidad cuando son trasplantadas a sitios fuera del útero en yeguas no preñadas (Adams et al. 2001).

Si bien la explicación más simple a la reacción materna contra las copas parece ser la derivada de la expresión de antígenos paternos en el MHC I, parece no ser del todo cierta, a pesar de que la faja y las células invasoras son claramente inmunogénicas. No se han encontrado diferencias entre la longevidad de las copas en preñeces experimentales en que existe compatibilidad antigénica materna y paterna, y la de copas de preñeces en que hay incompatibilidad antigénica. Además, tampoco disminuyó la vida de las copas en yeguas a las que se sensibilizó previamente a los antígenos del padrillo mediante un injerto de la piel del macho (Adams et al. 2007).

Las células trofoblásticas invasoras no expresan MHC II y sólo expresan MHC I hasta el día 44, entonces, cuando la copa se establece, pocos antígenos paternos son detectables, todo lo cual ayuda a evadir el ataque antigénico-específico de los linfocitos. No se entiende del todo para qué sirve expresar antígenos extraños en el trofoblasto invasor. En otras especies, se ha visto como la expresión de MHC tanto de tipo I como II está disminuida en el trofoblasto. Sin embargo en humanos y

ratones se ha visto el mismo patrón de expresión selectiva de MHC I en las células invasoras que se ve en equinos, por lo que parece una característica común de la placenta hemocorial de primates y roedores con la epiteliocorial de los equinos.

La propia célula de la copa tiene capacidad de secretar sustancias que suprimen la proliferación linfocitaria y su producción de citoquinas. Se ha estudiado el papel que las células T reguladoras cumplen en la gestación, y se cree que la expresión temporal de antígenos paternos en el MHC I podrían tener un papel importante en la inducción de la tolerancia materna al concepto equino. Se ha visto también que las células T en la gestación equina tiene disminuida notoriamente su capacidad de convertirse en células T citotóxicas. Se piensa entonces que esa expresión temporal de MHC I sirve para desarrollar células T helper que regularán la actividad citotóxica de los numerosos linfocitos que se acumulan luego alrededor de la copa (Antczak et al. 2012).

Para determinar los efectos del trofoblasto invasor sobre la proliferación linfocitaria, se desarrolló un método de cultivo conjunto de células del trofoblasto invasor aisladas con linfocitos extraídos de la sangre periférica. Se vio que la presencia de las células trofoblásticas o de sus secreciones, concentradas en un medio pre acondicionado, inhibían en un 50% o más la proliferación linfocitaria. La presencia de las células o sus productos debía ser constante para producir ese efecto, y no era efectivo en linfocitos previamente activados para proliferar. Todas las subpoblaciones de linfocitos se vieron afectadas igualmente. También se observó afectada negativamente la producción de citoquinas linfocitarias como la IFN γ , IL-2, IL-4 e IL-10 (Flaminio y Antczak, 2002).

Se han visto además importantes diferencias en las características de las poblaciones de linfocitos periféricos y los linfocitos del endometrio que rodean las copas endometriales, en la interfase meterno-fetal (de Mestre et al. 2010).

1.6 Copas endometriales persistentes

Se han detectado casos en que las copas no son destruidas normalmente alrededor del día 140 de gestación, sino que persisten por más tiempo. Luego de la tormenta de abortos en Kentucky en 2001 por el Síndrome de pérdida reproductiva en la yegua (Mare Reproductive Loss Syndrome, MRLS), se pudieron observar y documentar varios casos. Las copas persistieron por períodos variables de 6 a 30 meses, con un promedio de 18 meses (Steiner et al. 2006). Estos autores también observaron copas endometriales persistentes en yeguas luego de un parto normal. Wilsher y Allen, en (2012) describieron la persistencia de copas en la misma yegua en dos gestaciones sucesivas. Las yeguas que presentan copas persistentes no ciclan normalmente y son infértiles mientras ellas persistan (Steiner et al. 2006; de Mestre et al. 2011). Es un fenómeno con baja prevalencia. No está claro si ocurre porque el sistema inmune de la yegua falla, o las propias células trofoblásticas no desencadenan mecanismos de autodestrucción, como la apoptosis (de Mestre et al. 2011; Allen y Wilsher, 2012).

2. EL PRODUCTO DE LAS COPAS ENDOMETRIALES: LA GONADOTROFINA CORIÓNICA EQUINA (ECG)

2.1 Propiedades fisicoquímicas de la eCG

La eCG es una glicoproteína ácida de 72000 dalton de peso molecular, carga eléctrica negativa, y con un alto contenido en carbohidratos, mayormente ácido siálico, galactosa y glucosamina. Tiene un punto isoeléctrico bajo, de 2.4, y es muy resistente a la hidrólisis ácida (Rimington et al. 1944; citado por de Mestre et al. 2011).

Se ha purificado la hormona a partir de suero equino, y está disponible comercialmente. Se ha logrado producir eCG recombinante a partir de células de mamíferos, pero no en cantidades suficientes para un uso comercial y también a partir de células de insectos, pero esta eCG no tiene actividad in vivo debido a algunas diferencias estructurales (Chopineau et al. 1997; Legardinier et al. 2005).

La tirotropina y las gonadotropinas coriónicas y pituitarias son glicoproteínas heterodiméricas. Tienen dos subunidades, α y β , unidas de manera no covalente. La subunidad α es idéntica en todas estas hormonas dentro de cada especie, pero la subunidad β no. Esta subunidad es la que determina la función de cada hormona (Sugino et al. 1987).

La subunidad α de la eCG es una proteína de 96 aminoácidos, con un 68-79% de homología con las subunidades α de otras especies de mamíferos. La subunidad β de la eCG es una proteína de 168 aminoácidos, con 56 a 78% de homología con las subunidades β de otras especies de mamíferos. La subunidad β de la eCG y de la LH equinas está codificada por un mismo gen, lo que no ocurre por ejemplo en la especie humana con la hCG y la LH, en que un gen diferente codifica la subunidad β de cada hormona. La secuencia de aminoácidos de las subunidades β de la eCG y la LH son idénticas en el equino. Ambas tienen una extensión en el extremo carboxi terminal de 30 aminoácidos, que está glicosilada, y las diferencias entre la glicosilación son lo que distingue ambas hormonas (Wooding et al. 2001). La LH tiene oligosacáridos sulfatados y ácido siálico, mientras que en la eCG predomina el ácido siálico. Estas diferencias están dadas por la expresión de distintas enzimas responsables de la glicosilación en la adenohipofisis y en la faja coriónica (Murphy, 2012).

2.2 Propiedades biológicas

A diferencia de otras gonadotropinas, por ejemplo la humana (hCG), que sólo inducen respuestas del tipo LH cuando son administradas a otras especies de mamíferos, la eCG produce efectos tanto de LH como de FSH (Cole y Hart, 1930; citados por de Mestre et al. 2011). No se entiende completamente la base estructural de esta capacidad de unirse a los receptores tanto LH como FSH de otras especies. Como se dijo anteriormente, se cree que se deba a diferencias mínimas en las subunidades β de las diferentes hormonas. No hay evidencia que los carbohidratos que forman parte de la subunidad β tengan que ver con su afinidad a los receptores, pero sí tienen que ver con la vida media de la hormona (de Mestre et al. 2011). La gonadotropina coriónica de la burra también tiene ese efecto de FSH pero en mucho menor proporción que la equina (Stewart et al.

1977). Estudiando las diferencias estructurales entre las dos hormonas se ha determinado que la subunidad α también es importante para dicho efecto, y se han identificado algunos aminoácidos claves sin los cuales esta actividad se suprime (Chopineu et al. 1997). La vida media de la hormona en la sangre equina es de 6 días. Está determinada por el peso molecular de la hormona, su carga negativa, y su contenido de ácido siálico. Los niveles poco fluctuantes de la hormona que se encuentran en el suero de las yeguas gestantes se debe a su larga vida media, y a la liberación constante por parte de las copas endometriales (Martinuk et al. 1991). En otras especies la vida media de la eCG administrada es menor que en la equina, pero de todas maneras es larga, lo cual tiene consecuencias prácticas en su uso (de Mestre et al. 2011).

2.3 Dinámica de la eCG

Wooding et al. (2001), realizaron un estudio de inmunohistoquímica para comparar el mecanismo de producción, secreción y almacenamiento de la eCG y la LH. Se observó que la eCG es detectable inmunohistoquímicamente al día 32 en algunas células del ápex de los pliegues de la faja coriónica. En los dos días siguientes, se ven mayores cantidades de la hormona en las células, en los espacios entre pliegues, y en el espacio entre la faja y el endometrio, pero aún no difunde a lo profundo de las glándulas endometriales. La célula de la copa madura, grande y binucleada, tiene un citoplasma lleno de mitocondrias, cisternas de retículo endoplásmico rugoso y un aparato de Golgi desarrollado. Se detectó eCG en el Golgi, y en pequeños gránulos densos alrededor del Golgi y en el plasmalema periférico. Por esto se cree que la secreción de eCG sería por exocitosis, el mismo mecanismo para otras hormonas proteicas. Por otra parte, a pesar de ser estructuralmente casi idénticas, la LH se almacena en gránulos grandes y numerosos. Esta diferencia sugiere que la secreción de eCG se da de forma continua, sin necesidad de otras sustancias que estimulen su secreción, y la secreción de LH se da en grandes cantidades en respuesta a secretagogos. La eCG llega a la circulación materna mediante vasos linfáticos que se desarrollan bajo el estroma de cada copa (Antczak et al. 2012). La eCG aparece por primera vez en la sangre de la yegua preñada entre los días 37 y 40 post ovulación, y sus concentraciones aumentan a partir de ese momento hasta alcanzar un máximo alrededor de los días 55 a 70. El momento y las concentraciones máximas alcanzadas son muy variables entre yeguas, y van de 40 a 250 IU/ml (Wilsher y Allen, 2011; Murphy, 2012). Luego de alcanzar el pico de producción la concentración de la hormona va decreciendo, hasta hacerse imperceptible entre los días 100 y 140 (Cole y Hart, 1930; citados por Wilsher y Allen, 2011; Allen, 1969). La vida media de las células productoras de eCG parece ser fija, pues células de la faja coriónica implantadas en yeguas vacías sobreviven y secretan eCG por 75 a 100 días (de Mestre et al. 2011).

Con respecto al metabolismo de la eCG, Cole et al. (1967, citados por Wilsher y Allen, 2011) describieron una vida media de la hormona de 6 a 6.55 días en dos yeguas gestantes histerectomizadas alrededor del día 60 de gestación. Se ha sugerido que la hormona desaparece de la circulación de manera bifásica, estando el plasma, hígado y riñones relacionados con su metabolismo e inactivación (Aggarwal y Papkoff, 1981).

2.4 Factores que influyen en la producción de eCG

Existe considerable variación entre yeguas en el momento de producción máxima, y en la cantidad máxima de eCG secretada (Martinuk et al. 1990; Wilsher y Allen, 2011). Se ha visto que la producción de eCG está influenciada por varios factores. Entre ellos: tamaño de la yegua (Allen et al. 2002), número de gestaciones de la yegua (Murphy et al. 1985; citados por Wilsher y Allen, 2011), genotipo fetal (Boeta y Zarco, 2005; Allen, 1969; Boeta y Zarco, 2012), sexo del feto (Monke y Franz, 1985), gestación gemelar (Rowlands, 1949 citados por Wilsher y Allen, 2011) y ambiente materno (Allen et al. 1993). Además, hay una variabilidad individual entre yeguas y una influencia del progenitor macho del concepto (Martinuk et al. 1990). La influencia de algunos de éstos y otros factores será analizada a continuación.

La cantidad de eCG en la sangre materna es consecuencia de la cantidad de tejido de copa endometrial que tenga la yegua, que por su parte es consecuencia del tamaño de la faja coriónica que desarrolló el concepto y del contacto que ésta haya establecido con el endometrio al momento de la invasión (Wilsher y Allen, 2011). Bell y Bristol, en 1991, observaron que las yeguas que concebían al día 9 post parto producían mucha más eCG que yeguas que no concebían en el celo del potro. Se debe presumiblemente a la involución uterina incompleta y por tanto a una mayor superficie disponible en el momento de la invasión materna por las células de la faja coriónica. Sin embargo, yeguas mayores y multíparas con úteros péndulos y de escaso tono no producen mayores cantidades de eCG, lo cual se cree que se deba a que los cambios degenerativos propios de la edad en estos animales restringen el movimiento migratorio de las células trofoblásticas invasoras (Wilsher y Allen, 2011) y las células endometriales producen menos factores de crecimiento (Gerstenberg et al. 1999).

Huber et al. (1993) extrajeron quirúrgicamente las copas endometriales de 5 yeguas al día 50 de gestación. Pesaron la cantidad de tejido extraído, y a diferencia de lo expuesto anteriormente, encontraron que la cantidad de tejido no estaba linealmente relacionada con la concentración circulante de eCG en la yegua al momento de la cirugía. Atribuyen esto a que las copas no habían alcanzado su madurez total o su momento de máxima producción cuando se las extirpó.

El efecto más marcado sobre la producción de eCG lo tiene el genotipo fetal. Esto está determinado por el genotipo paterno aparentemente, puesto que cuando al padre es caballo (*Equus caballus*, 2n=64) la faja coriónica es más gruesa, sea la madre yegua o burra. Por el contrario, el padre burro (*Equus asinus*, 2n=62), tanto en yegua como en burras produce fajas coriónicas delgadas. Pero el ambiente materno ejerce su influencia: si un concepto mula es transferido como embrión en una burra, producirá una faja coriónica gruesa, como si estuviese gestando un concepto burdégano (madre burra y padre caballo). No se comprende el porqué de estos fenómenos (Antczak et al. 2012).

Wilsher y Allen (2011) estudiaron la influencia de la condición corporal materna, el ejercicio durante la gestación y el número de gestaciones sobre la producción de eCG. Encontraron que la condición corporal materna tenía una marcada influencia sobre la producción de eCG. Animales con mayor proporción de grasa corporal tendrían menos eCG. No se sabe exactamente cuál es el mecanismo por el cual se ejerce esta influencia. Se ha visto que los adipocitos humanos tienen

receptores hCG-LH, por lo que se piensa que si existieran en el equino, esos receptores podrían atrapar la eCG, disminuyendo su cantidad circulante. Este fenómeno sería de mayor magnitud en animales con mayor grasa corporal. Se corresponde con esto una observación personal de Maruri y Bocking de Uruguay, citada por Wisner y Allen (2011) de que las yeguas de un rodeo comercial destinado a la producción de eCG producen más en años en que presentan condiciones corporales moderadas a pobres al inicio de la gestación. Con respecto al ejercicio durante la gestación, se vio que las yeguas que se ejercitaban con caminatas diarias tenían concentraciones de eCG significativamente menores a partir del día 60 que las yeguas que no se ejercitaban, a pesar de que el ejercicio no generó diferencias significativas en el peso ni en la condición corporal entre los dos grupos de yeguas. No están claras las razones por las cuales esto ocurre. Se observó una llegada más precoz al pico de producción y una desaparición más temprana de la eCG en la sangre materna en la tercera preñez de yeguas que en sucesivos años fueron servidas con el mismo padrillo, con respecto a sus gestaciones anteriores. Esto se debe a que las yeguas desarrollan anticuerpos contra los antígenos paternos presentados por MHC de clase I en las células del trofoblasto fetal invasor. Al repetirse el padrillo, la respuesta humoral es más intensa, con mayores títulos de anticuerpos que alcanzan su pico de actividad más temprano en la gestación (Wilsher y Allen, 2012).

2.5 Funciones de la eCG: Rol luteogénico y luteotrópico

Se pensaba que la eCG, con sus funciones combinadas de FSH y LH, era la responsable del desarrollo y posterior luteinización de los numerosos cuerpos lúteos suplementarios que se forman en los ovarios de la yegua gestante entre los días 40 y 150 (Allen, 1970). Pero se ha demostrado que la FSH pituitaria, que se continúa liberando cada 10 a 12 días en la preñez temprana como si la yegua continuara con sus ciclos estrales normales, es quien estimula las ondas foliculares. La eCG es la responsable, mediante su acción tipo LH, de la ovulación o luteinización de los folículos más avanzados de cada onda (Urwin y Allen, 1982; Antczak et al. 2012). También se ha encontrado una afinidad mucho menor de la eCG por los receptores gonadales de LH y FSH en el equino que en otras especies, lo cual explica por qué los ovarios de la yegua no son hiper estimulados por la eCG como ocurre en otras especies (Stewart y Allen, 1981).

Los sucesivos cuerpos lúteos accesorios se van sumando, y persisten hasta aproximadamente la mitad de la gestación, en que la placenta está lo suficientemente madura para hacerse cargo de la producción de progestágenos que mantienen la preñez. La eCG, además, estimula a estos cuerpos lúteos a secretar tanto progesterona como estrógenos, regulando la expresión de enzimas relevantes en las células luteales (Daels et al. 1998). Se observa una elevación pronunciada en la concentración de estrógenos séricos en la yegua preñada que coincide con el comienzo de secreción de eCG, alrededor de los días 37-40. Daels et al. (1998) demostraron que quien los secretaba eran los CL, no los folículos. A pesar de que la eCG se une al receptor de LH en el equino, su potencia es muy inferior que la de la LH (Saint-Dizert et al. 2004). Tiene sólo un 2 o 3 % de la potencia de la LH, pero las concentraciones circulantes de eCG son tan altas en la gestación que se piensa que sería suficiente para promover la formación de los cuerpos lúteos suplementarios (Boeta y Zarco, 2005; Boeta y Zarco, 2012).

La eCG también tiene un efecto luteotrópico en el cuerpo lúteo primario, que aumenta su producción de progesterona en los días 35 a 38, concurrentemente con el surgimiento de la eCG en la circulación materna. El CL primario expresa receptores para eCG desde el día 14 hasta al menos el día 100 de gestación, y responde a la administración exógena de eCG aumentando su producción de progesterona antes de que aparezca la eCG materna. La desaparición de los cuerpos lúteos, tanto primarios como suplementarios, luego del día 120 de preñez, coincide con la caída de eCG producida por la degradación de las copas endometriales (Boeta y Zarco, 2012).

Analizando los roles luteogénico y luteotrópicos de la eCG, Boeta y Zarco (2012) estudiaron las diferencias entre yeguas con gestación equina y yeguas con gestación mular. En las últimas del desarrollo de las copas endometriales, y por tanto la cantidad de eCG, son menores. Entre las semanas 6.5 y 13, la concentración de eCG fue significativamente menor en las gestaciones mulares, en las que alcanzó un pequeño pico a la semana 7 y luego declinó hasta niveles basales a la semana 11. En cuanto al efecto luteotrópico de esta eCG, se vio que no hubo diferencias significativas en las concentraciones de progesterona hasta la semana 7, pero si a partir de la 9, en que la progesterona aumentó abruptamente en las gestaciones equinas, mientras que en las mulares comenzó a descender en este momento, hasta el final de la gestación. Los receptores de LH-eCG en el CL primario disminuyen significativamente luego de la semana 8 de gestación, por lo que la escasa eCG circulante en las gestaciones mulares no alcanza para estimular al CL hasta niveles de producción equivalentes a los de la gestación equina. Tanto yeguas con gestaciones equinas como mulares desarrollaron cuerpos lúteos suplementarios (CLS) en ese estudio, el primero de los cuales siempre fue por ovulación. Sin embargo el número de CLS fue significativamente mayor en gestaciones equinas que en mulares. En los dos grupos, los CLS se formaron aproximadamente al mismo tiempo, sugiriendo que las yeguas en gestación mular presentan las mismas ondas foliculares que las de gestación equina, dependientes de la FSH pituitaria y no de la eCG. En las yeguas con gestación equina, las diferencias en el número de CLS desarrollados sí estarían relacionadas con la concentración de eCG circulante al momento de la formación de los mismos. Las yeguas que desarrollaron un segundo CLS tenían concentraciones de eCG significativamente mayores en las dos semanas previas a la formación del CLS que las que no lo formaron. La misma diferencia se observó entre las que desarrollaron un tercer CLS y las que desarrollaron sólo un segundo CLS. Dentro de las gestaciones mulares, se observó un pequeño aumento de eCG entre las semanas 5 y 7, y la primera ovulación secundaria ocurrió a la semana 7. Sin embargo, no hubieron diferencias significativas entre la eCG circulante en las dos semanas previas a la formación del segundo CLS entre yeguas que formaron ese segundo CL y las que no lo hicieron. Las concentraciones de eCG en esas yeguas en ese momento eran casi basales. La formación o no de un segundo CL en estas yeguas se podría deber a diferencias individuales de sensibilidad a la eCG, o a la LH circulante. Las yeguas con más CLS producen más progesterona, y yeguas con más eCG producen más progesterona a igual número de CL. No ocurre igual en gestaciones mulares, en las que no hay diferencia significativa en la progesterona producida por uno o dos CLS, ni de acuerdo a la concentración de eCG. Allen (1984) sostenía que en estas gestaciones interespecíficas, la función luteal era mantenida por la LH. También sugiere que algunas yeguas que llevan a término

conceptos burros implantados por transferencia embrionaria, en que hay ausencia de eCG, la LH pituitaria se haría cargo de mantener la función luteal necesaria para mantener la gestación. Pero durante los meses del año en que la LH pituitaria está normalmente deprimida por influencia del fotoperiodo, la eCG podría cumplir el rol de manutención de la función luteal(Allen, 2001). Allen ya había sugerido que la eCG no es esencial para la gestación. Sin embargo este autor propone que la eCG podría proteger a las yeguas gestantes de los efectos luteolíticos de las prostaglandinas (PG), y dicha protección es menor o ausente en las yeguas que gestan mulas.

2.6 Otras funciones.

Se piensa que la eCG estimula el crecimiento y producción de esteroides en las gónadas fetales, porque se han encontrado receptores para eCG en las gónadas fetales (Saint Dizier et al. 2004). Pero esto no está confirmado, puesto que el crecimiento masivo de las gónadas fetales comienza al día 100, cuando los niveles de eCG ya han bajado significativamente en la sangre materna, y se cree además que la eCG no atravesaría la placenta (Rowlands, 1963; citado por de Mestre et al. 2011).

Wilsher y Allen (2009), en su revisión sobre la placentación, sugieren que la eCG posibilitaría el desarrollo de la placenta difusa de la yegua. Stewart et al.(1994) en un estudio usando hibridación *in situ*, mostraron que ciertos factores determinantes para la placentación sólo se expresan en el endometrio luego del día 30 de la gestación. El mRNA del factor de crecimiento epitelial (EGF), y del factor de transformación $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), aparece súbitamente entre los días 33 y 38 de gestación, y continúa presente hasta el término de la misma. Se sabe que esta aparición repentina es enteramente dependiente de la acción ininterrumpida de la progesterona sobre el endometrio a partir del momento de la formación del cuerpo lúteo primario. Se sabe que el EGF cumple un rol importante en la placentación humana, por tanto se cree que podría tener la misma función en el equino. De todo lo anterior se podría concluir que la función de la eCG sería estimular secuencialmente los siguientes procesos: incrementar la producción de progesterona materna, que estimularía la producción de EGF en el endometrio, el cual posibilitaría la interdigitación progresiva del corion y el endometrio hasta lograr la placentación completa.

Se ha propuesto una relación entre la formación de las copas endometriales con la posterior comienzo de la implantación, con la formación de las microvellosidades coriónicas que interdigitan con el endometrio materno. La secuencia temporal de su ocurrencia lo sugiere, y el hecho que la falla de la implantación y placentación que ocurre luego de la falla en la formación de copas endometriales que ocurre en el modelo experimental de gestación de concepto burro x burro en yegua, parece confirmarlo (Allen et al. 1987).

A pesar de todo lo expuesto anteriormente, no se logra entender completamente la función de las copas en la gestación. Es así que se han reportado casos de gestaciones que llegan a término a pesar de que no se lograron formar copas endometriales, y por tanto en ausencia de eCG y de ovulaciones secundarias(Allen y Wilsher, 2009).

2.7 Usos de la hormona en otras especies

Por sus propiedades tipo FSH y LH combinadas, la eCG es usada de manera extendida como gonadotropina exógena para estimular el desarrollo folicular de y la ovulación en animales de laboratorio y en especies domésticas (de Mestre et al. 2011). Se usa para la inducción del estro en animales inmaduros en cerdos y ovejas. En cerdos, por ejemplo, hay un uso extendido de bajas dosis de eCG para inducir desarrollo folicular y hCG para inducir ovulación (Bartlett et al. 2009). Se ha usado para acortar anestro postparto en vacas, una de cuyas causas es la reducida secreción de gonadotropinas, y también en programas de transferencia embrionaria (Bo et al. 2003). Se ha visto que puede sacarse provecho de la acción LH sobre otras especies no equinas: mejoraría función luteal, y con ello el éxito de la gestación (Baruselli et al. 2010).

2.8 eCG en yeguas vacías.

Se cree que eCG sólo es secretada por las células especializadas de las copas endometriales durante la gestación. Estudios recientes encontraron que el útero de las mujeres no embarazadas segregan hCG. Por ello, Bottcher et al. (2014) estudiaron si un fenómeno similar se daba en la especie equina. En muestras de tejido endometrial de nueve yeguas, se realizó un análisis por PCR para detectar mRNA para eCG/LH. Seis de las nueve muestras revelaron expresión de genes LH-eCG, indicando síntesis hormonal en diferentes etapas del ciclo estral. La hormona pudo detectarse también por inmunohistoquímica, especialmente en las células epiteliales de las glándulas endometriales. La relevancia de estos hallazgos aún no está determinada.

3. INDEPENDENCIA DE LAS COPAS ENDOMETRIALES Y EL CONCEPTO

Una característica con importante aplicación práctica de la biología de las copas endometriales es su independencia del concepto, a pesar de su origen trofoblástico. Si por cualquier razón, la preñez se pierde luego del día 40, cuando ya ocurrió la invasión del endometrio por la faja coriónica, las copas endometriales continuarán con su ciclo de vida y produciendo eCG hasta su degradación normal (Jeffcot et al. 1987; Allen, 1994; Allen y Wilsher, 2009; de Mestre et al. 2011; Wilsher y Allen, 2012; Aguilar et al. 2012; Cuervo Arango et al. 2015). Aún no se sabe cómo y con qué finalidad ocurre este fenómeno. Una de sus consecuencias prácticas es que la detección de eCG no es una herramienta a utilizar para hacer un diagnóstico de gestación en la yegua. Sólo indica la presencia de copas endometriales (Jeffcot et al. 1987).

3.1 Dinámica de la eCG luego del aborto

Se ha comparado la dinámica de la eCG luego del aborto con la dinámica normal en la yegua gestante, induciendo la pérdida gestacional mediante diferentes maniobras y en diferentes momentos de la gestación.

En un experimento diseñado para desarrollar un método no invasivo de monitoreo fetal mediante la medición de estrógenos, progesterona y eCG; al día 45

de preñez las yeguas del grupo problema fueron anestesiadas y el fluido fetal reemplazado por solución salina hipertónica. Como grupo control se usaron yeguas que fueron anestesiadas y su útero expuesto, pero el concepto no fue tocado. En el grupo problema todas las yeguas abortaron, en el grupo control ninguna lo hizo. La concentración sérica de eCG fue monitoreada desde el día 10 al 55 de gestación. A partir del día 38 hasta el 45 se observó un aumento rápido de eCG en plasma en ambos grupos y se alcanzaron concentraciones pico más altas en el grupo control que en el problema. Hubo una baja en la concentración luego del procedimiento quirúrgico en ambos grupos, pero a las 24 horas post operación se habían restablecido las concentraciones preoperatorias. Del día 46 al 55 día en que se concluyó el experimento, la eCG siguió aumentando paralelamente, siempre siendo mayores en el grupo control que en tratado, salvo en el día 49 para lo que no se encontró explicación. Los perfiles de secreción fueron similares. La pérdida del concepto por este método no afectó significativamente la producción de eCG (Jeffcot et al. 1987).

La producción de eCG tampoco se vio afectada por el aborto inducido por inyecciones de PG al día 70, y continuó dentro de la dinámica normal acorde a la edad gestacional de la yegua (Squires et al. 1980).

Ferreira y colaboradores (2005) encontraron diferencias en la producción de eCG en yeguas que abortan al día 70-75 y yeguas que siguen adelante con la gestación. No encontraron diferencias entre los perfiles de eCG según diferentes métodos de aborto (inducción manual o aplicación de PG).

3.2 Actividad reproductiva luego del aborto en presencia de copas endometriales

Antes del establecimiento de las copas endometriales funcionales, las yeguas que sufren pérdidas embrionarias suelen reanudar sus ciclos estrales normales rápidamente, y suelen reconcebir en la misma temporada. El veterinario se encuentra frecuentemente con estos eventos en la práctica diaria de la reproducción equina, y hay varios estudios que lo documentan. Once yeguas que perdieron su gestación por inyección de PG antes del día 31 de gestación reanudaron la actividad cíclica inmediatamente mostrando estro de 3 a 5 días post aborto, y 8 de 11 yeguas concibieron nuevamente en el primer estro post aborto (Penzhorn et al. 1986). Squires et al. (1980) compararon los efectos de la inducción del aborto con PG a diferentes edades gestacionales. 100% de las yeguas que recibieron 250 µg de cloprostenol (análogo sintético de PG) al día 32 de gestación abortaron 3.7 ± 0.4 días post inyección. Presentaron estro 11.2 ± 7.1 días, y ovulación 15.2 ± 7.2 días post aborto. No hubieron estros anovulatorios, pero 2 de 8 yeguas ovularon sin presentar comportamiento estral típico antes de primer estro con ovulación.

Pero en presencia de copas endometriales, luego del aborto las yeguas presentan diversas anomalías en su ciclo estral: estros anovulatorios, ovulaciones silenciosas sin comportamiento estral, función luteal prolongada, o anestro con ovarios pequeños y no funcionales (Penzhorn et al. 1986; Rathwell et al. 1987; Huber et al. 1993; Allen, 1994; Allen, 2003; Zent, 2003). El estro normal seguido de ovulación demora un tiempo variable en aparecer, dependiendo del día de gestación en que ocurra el aborto, como se describirá más adelante. La mayoría de

las yeguas que abortan no suelen volver a preñarse en la misma temporada. Esto había sido observado por los veterinarios que descubrían e interrumpían gestaciones gemelares después del día 40, antes de que se usara extensivamente la ultrasonografía, herramienta que permite un diagnóstico y manejo precoz de las gestación (Penzhorn et al. 1986; Allen, 2003; Zent, 2003).

Una vez establecidas las copas, aunque se pierda el concepto por cualquier causa, la eCG circulante continúa haciendo que ovulen o se luteinicen los folículos mayores de cada onda producida por los picos de FSH pituitaria liberados regularmente durante la gestación. Estos cuerpos lúteos impiden el retorno al estro, y deben administrarse múltiples inyecciones de PG para eliminarlos (Allen, 2003). Debido a la presencia de varios cuerpos lúteos suplementarios de diferente edad y madurez, una sola dosis de PG no logra una luteólisis completa, y además, se ha demostrado que no impide que las copas endometriales continúen produciendo eCG, ni que ésta última siga actuando. Múltiples inyecciones de PG eventualmente completan la luteólisis, y si hay un folículo lo suficientemente maduro, la yegua podría retornar al estro, pero la eCG circulante puede luteinizarlo rápidamente y la yegua saldrá del estro sin ovular (Squires et al. 1980; Zent, 2003).

Durante el brote de MRLS en Kentucky, Estados Unidos, en 2001, se perdieron miles de gestaciones de entre 40 y 80 días, y muy pocas de éstas yeguas retornaron a los ciclos estrales normales mientras las copas endometriales persistieron. Zent, W. (2003) en una revisión sobre el brote de MRLS relató que aunque luego de los abortos las yeguas solían tener infecciones bacterianas uterinas, éstas infecciones se resolvieron rápidamente, y no fueron la razón por la cual las yeguas quedaron vacías. La principal razón fue que las yeguas no ciclaron normalmente luego del aborto. Se probaron diversos protocolos para lograr que esas yeguas volvieran al estro para poder ser preñadas nuevamente en esa temporada, pero en general no fueron exitosos. Se intentó suplementar con estradiol y progesterona para inhibir la producción pituitaria de FSH, para sincronizar los ovarios, y para utilizar menos dosis de PG, pero el problema de la luteinización por eCG persistía. Por otra parte, yeguas que perdían la gestación más allá del día 80 solían tener ovarios quiescentes y pequeños, que no producían folículos a pesar de que se lograra la luteólisis total. Se probaron GnRH, domperidona, sulpiride y deslorelina en estas yeguas, pero con muy escaso éxito. En definitiva, la mayoría de la yeguas con copas endometriales funcionales permanecieron en este estado irregular hasta que las copas desaparecieron normalmente, alrededor de lo que se correspondería con el día 150 de su gestación interrumpida. Las yeguas que no concibieron en esa misma estación reproductiva lo hicieron sin problema en la siguiente .

Hay varios estudios sobre el momento de aparición del estro y logro de una segunda gestación luego del aborto en presencia de las copas endometriales.

En un experimento diseñado para determinar el efecto de inyecciones diarias de PGF₂ α en la actividad ovárica y el comportamiento de yeguas con copas endometriales formadas, un grupo de yeguas preñadas recibió una inyección diaria de 5mg de dinoprost, análogo sintético de PG (nombre comercial: Lutalyse, Zoetis) desde el día 42 de preñez hasta el primer día de estro post aborto, y otro grupo recibió igual tratamiento hasta el primer día del segundo estro post aborto. Las yeguas de ambos grupos mostraron estro alrededor de 4 días después de la primer inyección de PG. El comportamiento estral duró aproximadamente 5 días en el

primer grupo, y la ovulación ocurrió en promedio a los 8 días después de la primer PG, pero 2 de 3 no mostraron más estros luego de ese primero. En el segundo grupo, que sólo era de dos yeguas, los estros duraron 2 y 6 días, y las ovulaciones ocurrieron 5 y 9 días después de la primer PG. El segundo estro en este grupo ocurrió al séptimo día del primer estro, duró 2 a 3 días y fue seguido de ovulación. Todas las yeguas fueron cubiertas en el estro en que se interrumpía la PG, pero ninguna concibió (Rathwell et al. 1987).

Penzhorn et al. (1986) indujeron el aborto mediante inyección del mismo análogo de PG recién mencionado. De 8 yeguas que abortaron conceptos de 39 a 50 días, una no retornó al estro (39 días de gestación al momento de la reabsorción), y las otras 7 mostraron estro 4 a 6 días post PG. Sólo 2 concibieron: una sola en ese primer estro, y reabsorbió antes de los 90 días. Otra concibió al segundo estro, 17 días post PG, y llegó a término. Las restantes mostraron estros con pocos signos y ciclos irregulares. Ninguna de éstas últimas concibió por segunda vez esa temporada, pero todas concibieron sin problemas en la siguiente. No se monitorearon las concentraciones de eCG en ninguno de los dos estudios descritos previamente.

Squires et al. (1980) compararon los efectos de la inducción del aborto con PG a diferentes edades gestacionales. Los resultados de la inyección al día 32 ya se describieron. Una sola inyección de 250µg de cloprostenol no provocó el aborto cuando fue administrada al día 70 de gestación. Esto se debería a que no es posible provocar la luteólisis completa de los cuerpos lúteos suplementarios presentes al día 70 con una sola aplicación de PG. Sí abortaron todas las yeguas a las que se les administraron dosis repetidas de PG, cada 12 o 24 horas por un máximo de 4 días, a partir del día 70. Se demostró que la administración cada 24 horas es suficiente, ya que las yeguas a las que se les administró cada 12 horas no abortaron antes que las que recibieron una inyección diaria. Si bien la progesterona circulante cayó, la producción eCG no se vio alterada por la luteólisis. Con respecto al desempeño reproductivo post aborto, el estro y la ovulación demoraron mucho más en aparecer en el grupo que abortó al día 70 que en el grupo que abortó al día 32. En este primer grupo, con una inyección diaria de PG, el estro se presentó 45.2 ± 9.1 días post aborto, y la primera ovulación 51.4 ± 8.3 días post aborto. Con dos inyecciones diarias de PG, el estro se presentó 36.2 ± 7.8 días post aborto, y la primera ovulación 41.5 ± 7.9 días post aborto. En ambos grupos seis de ocho yeguas presentaron al menos un estro anovulatorio antes del primer estro con ovulación. Dos yeguas de cada grupo ovularon sin estro antes de primer estro con ovulación. Aunque se logre la completa luteólisis, ésta no corrige el desempeño reproductivo irregular de éstas yeguas.

Huber et al. (1993) removieron quirúrgicamente los conceptos y las copas endometriales de 5 yeguas gestantes al día 50. Todas las yeguas demostraron estro, fueron inseminadas y ovularon dentro de los primeros 44 días post cirugía. No detallan la variabilidad de comportamiento entre las yeguas. Estos autores monitorearon la concentración de eCG en su experimento, y los resultados serán discutidos más adelante.

Resumiendo y comparando los trabajos anteriores, y concentrándonos en el momento de aparición del estro post aborto, Rathwell et al. (1987) encontraron que sus yeguas reanudaban la actividad cíclica mostrando estro a los 4 días después del aborto al día 42, coincidiendo con Penzhorn et al. (1986) que indujeron

aborto entre días 39 a 50 y cuyas yeguas retornaron al estro en 4 a 6 días luego de múltiples inyecciones de PGF2. Squires et al. (1980) vieron que el estro seguido de ovulación demoró al menos 36 días en presentarse luego del aborto al día 70. Se atribuye la diferencia a la etapa en la gestación en que los abortos fueron inducidos. El estudio de Penzhorn et al. (1986) no discrimina el comportamiento de cada yegua de acuerdo al día del aborto, que varía de 39 a 50.

Recientemente, Aguilar et al. (2012) describieron la reutilización de yeguas receptoras en un programa de transferencia embrionaria comercial para la industria del Polo en Argentina. En estos programas, es una práctica común interrumpir una gestación producto de transferencia embrionaria si el concepto es macho. Luego de realizar el sexado fetal alrededor del día 60, si éste es macho, se induce el aborto. Como la yegua receptora representa uno de los mayores costos en estos programas comerciales, se ha intentado reutilizar estas yeguas luego del aborto inducido. De acuerdo a lo descrito en la bibliografía, la mayoría de estas yeguas con sus copas endometriales funcionales no volverían a concebir hasta el día 140 aproximadamente de la gestación interrumpida. En el mencionado estudio se analizó el comportamiento de 104 yeguas con fetos macho que fueron inducidas a abortar mediante la inyección transcervical de 500 µg de cloprostenol en 10 cc de solución salina. Todas abortaron dentro de las primeras 48 horas post inyección. De las 104, sólo 49 yeguas (47,1%) recibieron embriones nuevamente. Las restantes no recibieron embrión porque fueron retiradas por razones de manejo que no se detallaron (20%), porque no ciclaron luego del aborto (27,9 %) y porque ovularon pero no fueron transferidas por otros motivos que no se especificaron (5%) . El intervalo entre aborto y primera ovulación detectada fue de 8 a 65 días, con una media de 25.8 ± 5.1 días. Para las yeguas que volvieron a gestar, la tasa de preñez fue de 79.6% (39/49), y la tasa de pérdida embrionaria al día 60 fue de 7.7 % (3/39). Estas cifras no difieren significativamente de los datos de tasa de preñez (81.06 %) y de pérdida embrionaria (13.1%) del grupo considerado como control, que fueron las receptoras que no habían abortado previamente. Estos autores concluyeron que pueden usarse aproximadamente el 50% de las receptoras que abortan, con una eficiencia reproductiva similar a las yeguas que no abortan. Agregaron que las yeguas que no ciclan pueden estar afectadas por la época del año, la presencia de copas endometriales, y otras razones que deben investigarse. No relacionaron la performance de la receptora con la concentración de eCG.

En otro trabajo, Cuervo Arango et al. (2015), siguieron la performance reproductiva de 32 yeguas a las que se le indujo el aborto al día 65 de la misma forma que en el experimento anterior. El 6% de esas yegua entraron directamente en anestro luego del aborto, y el resto tuvieron actividad ovárica. El 37,5% ovularon en su primer ciclo post aborto, y el 56,2% tuvo 1 o 2 ciclos anovulatorios previo a ovular o entrar en anestro. El intervalo aborto a primera ovulación fue de 28.5 ± 3.3 días, con un rango de 5 a 65 días. De las 32 yeguas, 20 fueron reutilizadas como receptoras en la misma temporada, realizándose la transferencia a una media de 57.6 ± 4.4 días post aborto. El 90 % yeguas transferidas mantuvieron la gestación. Estos autores aclaran específicamente que no es esperable una tasa de preñez obtenida mediante inseminación similar a la que ellos obtuvieron mediante transferencia embrionaria, adjudicando este hecho a deficiencia en la competencia del oocito por la presencia de eCG más que a interferencias entre las copas endometriales y el embrión.

3.3 Concentración de eCG y comportamiento reproductivo

Se cree que la concentración de eCG de cada yegua está relacionada con el comportamiento reproductivo posterior al aborto (Huber et al. 1993; Allen, 2003; Zent, 2003). Así, yeguas que han desarrollado pequeñas copas endometriales y por tanto bajos niveles de eCG, por ejemplo, menores a 30 UI/ml entre los días 40 y 80, frecuentemente retornarán el estro luego de la luteólisis inducida por varias inyecciones de PG. Si se sirven estas yeguas, pueden quedar preñadas nuevamente, y aparentemente las concentraciones de eCG remanentes no impiden el desarrollo embrionario ni la placentación en esta segunda gestación. En yeguas con alto nivel de producción de eCG, más de 80 UI/ml, por ejemplo yeguas que abortaron mellizos, se ha visto que los ovarios se vuelven pequeños, duros y completamente inactivos, y la yegua entra en un anestro del que solo sale cuando se degeneran las copas endometriales (observaciones no publicadas de Allen, mencionado por Allen, 2003). Yeguas a las que se les extirparon concepto y copas endometriales por vía quirúrgica al día 50 mostraron estro y ovulación post aborto cuando presentaban menos de 700 ng/ml (7 UI/ml), y concibieron cuando tenían menos de 200ng/ml (2 UI/ml). En esta segunda gestación la producción máxima de eCG fue mayor que la que presentaban la momento de la cirugía en la gestación anterior (Huber et al. 1993).

Cuervo Arango et al.(2015) estudiaron la concentración de eCG en 32 yeguas al momento del aborto inducido al día 65, y encontraron que esta era extremadamente variable: 0.1 a 89.8 UI/ml, con una media de 33.4 ± 3.7 UI/ml . Las yeguas que ovularon post aborto lo hicieron con un promedio de 6.1 ± 2.6 UI/ml, en un rango de 0.1 a 20.8 UI/ml al momento de ovular. La yeguas que recibieron un nuevo embrión lo hicieron en promedio con 0.9 ± 0.3 UI/ml, en un rango de 0.1 a 3.6 UI/ml al momento de la transferencia. Estos autores encontraron una pobre correlación entre la concentración de eCG al momento del aborto y el intervalo aborto-nueva gestación.

4. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA: REPERCUSIONES PRÁCTICAS DE LA BIOLOGÍA DE LAS COPAS ENDOMETRIALES.

En un estudio sobre 1396 yeguas SPC, en condiciones óptimas de manejo y atención veterinaria en una temporada, se observó una pérdida gestacional general del 12%. De todas las gestaciones perdidas, el 61% se perdió antes del día 40. Las razones que se estiman para esta pérdida temprana son, por ejemplo, defectos cromosómicos al momento de la fertilización, e inadecuada producción de histotrofo (Morris, 2002). Como se describió anteriormente, si bien esto tiene un gran impacto económico, las yeguas suelen volver a preñarse en la misma temporada. El 39% restante, que aborta luego del día 40, es el que nos interesa en esta revisión, pues probablemente se pierda una temporada en la vida productiva de éstas yeguas. Si bien las pérdidas gestacionales luego del día 40 son menos del 5% del total de pérdidas, hay situaciones donde ese porcentaje aumenta desmesuradamente, como fue el brote de MRLS en 2001.

La gestación de gemelos es indeseable en la yegua. Menos del 9% de las gestaciones gemelares llegan a término. De los mellizos nacidos, sólo en el 21% de los casos alguno sobrevive, y su pronóstico a largo plazo es desfavorable (Raggio et

al. 2008). Históricamente, las gestaciones gemelares eran la causa del 10-30% de los abortos equinos. Si bien esta cifra ha disminuido al 6% a consecuencia de las mejoras en la detección temprana y en el manejo de las gestaciones gemelares en la yegua, aún sigue siendo una causa de pérdidas económicas en la industria equina (Macpherson y Reimer, 2000). La gran incidencia de ovulaciones dobles y gestaciones gemelares en algunas razas, concretamente en el Pura Sangre de carrera, hace que sea una práctica rutinaria revisar ecográficamente a las yeguas al día 14 post ovulación para realizar un diagnóstico de gestación, y al día 17 nuevamente, para detectar gemelos producto de ovulaciones asincrónicas que pueden no haberse visto en la primera ecografía. Con los métodos disponibles actualmente, la reducción de los mellizos antes del día 35 de gestación tiene hasta un 90 % de éxito (Wolfsdorf, 2006). Más allá del día 35 el éxito de la reducción varía según el método empleado, terminando probablemente en la pérdida de ambos conceptos, y tendrá la complicación adicional de que las copas endometriales ya estarán formadas, impidiendo el normal retorno a la ciclicidad en éstas yeguas (Macpherson y Reimer, 2000; Wolfsdorf, 2006).

La finalización de una gestación indeseada es un motivo de consulta frecuente en la práctica clínica. De acuerdo a la etapa de la gestación, como ya se revisó, esto se logra con diferentes procedimientos, y el pronóstico funcional y económico de la yegua difiere.

Puede querer optarse por detener la gestación por razones económicas, como es el caso ya descrito para las yeguas de Polo (Aguilar et al. 2012, Cuervo Arango, 2015), o para obtener un segundo ciclo anual de producción de eCG en yeguas de manadas utilizadas para tal fin.

Entonces, cualquiera sea la causa de la pérdida gestacional posterior a la formación de las copas endometriales, es importante que el veterinario pueda asesorar al cliente de sus consecuencias sobre el desempeño reproductivo de la yegua luego del aborto. Ante una yegua que ha perdido su gestación en presencia de las copas endometriales, las herramientas de las que podría valerse un veterinario para establecer un pronóstico reproductivo para la misma temporada, son la cuantificación por ELISA de la eCG circulante y la cuantificación de la progesterona circulante, para evaluar el éxito de la luteólisis inducida con PG. El veterinario también debe conocer las opciones actuales para deshacerse de las copas endometriales, y sus consecuencias sobre la posterior fertilidad. Para destruir las copas endometriales, la ablación láser o quirúrgica son opciones que se han ensayado con éxito variable (Allen, 2003; Huber et al. 1993)

La ablación con láser de las copas endometriales no puede lograrse en una sola sesión, por el riesgo de perforar la pared uterina, pero repetidas sesiones dan como resultado una reacción inflamatoria intensa que termina destruyendo la copa (observaciones no publicadas de W.R. Allen, V. Bracher y R. Stone, mencionadas por Allen, 2003). Al día 40 de la gestación el tejido blando de la copa endometrial es fácilmente afectado si se dispara en 3 o 4 puntos durante 3 a 5 segundos con un láser con energía moderada, de 50-60 W. Si se controla a la yegua 14 a 18 días después, la copa se ve claramente necrótica, incluso desprendida del endometrio (Allen, 1994).

También se ha intentado la extracción quirúrgica de las copas endometriales. Como ya se comentó, 5 yeguas a las que se les extrajo

quirúrgicamente el concepto y las copas endometriales al día 50 de gestación mostraron estro, ovularon y fueron inseminadas dentro de las 44 primeros días post cirugía, y 3 yeguas concibieron, 2 de ellas en el mismo cuerno del cual fue removido quirúrgicamente el concepto anterior (Huber et al. 1993). Estos autores evaluaron en la necropsia los efectos de la cirugía sobre el útero, y encontraron que el procedimiento quirúrgico no impactó negativamente de manera significativa en la posterior fertilidad, aunque no evaluaron efectos a mayor plazo.

HIPÓTESIS

Luego de la interrupción de la gestación entre los días 70 y 77, yeguas con baja producción de eCG tienen mayores tasas de ovulación y concepción que yeguas con alta producción de eCG.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar el desempeño reproductivo de yeguas luego de la interrupción de la gestación alrededor del día 70.

Objetivos específicos

Verificar si el retorno a la ciclicidad y la capacidad de concebir después del aborto están relacionados con la concentración de eCG al momento del mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Local y animales

El presente experimento fue conducido en los meses de febrero, marzo y primer mitad de abril de 2014, en el campo experimental nº 1 de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de República Oriental del Uruguay, ubicado en Migues, departamento de Canelones (34°22'Sur; 55°36' Oeste). Se contó con previa aprobación del proyecto por parte de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la misma institución (Protocolo nº 111130-001645/14).

Las yeguas utilizadas son parte de una manada de propiedad privada, compuesta por yeguas y padrillos mestizos, de tipo criollo, mantenidos a campo natural a una razón de 20 yeguas por padrillo. El diagnóstico de gestación y estimación de la edad gestacional se realizan por palpación transrectal y examen ultrasonográfico (Aloka SSD500, Tokio, Japón) alrededor del día 25 de gestación. Fueron seleccionadas 22 yeguas preñadas, con edad gestacional conocida y aproximadamente igual entre sí (72.7 ± 1.8 días al día de inicio del experimento, con una rango de 70 a 77 días). Esta gestación se denominó **primera concepción**. Las yeguas tenían una media de 6 años (rango 3 a 14 años), y una condición corporal promedio de 2/5 (Escala de Henneke modificada por Malschitzky et al. 2001).

Además se utilizaron 5 yeguas vacías y cíclicas provenientes de la misma manada, con iguales características raciales, etarias y de condición corporal. Debido a que el experimento se realizó en la segunda mitad de la estación reproductiva, este grupo sirvió para evaluar el efecto de la estación sobre la ciclicidad y descartar que un posible no retorno a la misma ocurra por efecto estacional.

La duración total del experimento fue de diez semanas. Los exámenes ginecológicos y las extracciones de sangre fueron realizados en el cepo techado específico para manejo de equinos del campo experimental nº1 de la Facultad de Veterinaria.

Manejo reproductivo

Cuando la edad gestacional de las yeguas fue de aproximadamente 70 días, la preñez se reconfirmó mediante examen ginecológico y ecográfico, e inmediatamente se indujo la interrupción de la gestación, mediante ruptura digital de las membranas fetales, según lo descrito por Lofsted (1986). Este momento fue considerado el día cero de nuestro experimento. La edad gestacional promedio era de $72,7 \pm 1.8$ días (rango de 70-77 días). Dos días después se verificó el aborto por palpación transrectal y examen ecográfico del tracto genital.

A partir de este día, a un régimen de dos veces por semana, se realizó un seguimiento ecográfico de la actividad ovárica y el status uterino. Previo al examen, las yeguas en grupo fueron monitoreadas visualmente para evidenciar signos de receptividad sexual ante un padrillo mantenido en un corral adyacente.

Al evidenciarse al examen ginecológico un folículo dominante mayor a 35mm, se evaluó y registró la presencia de edema uterino acompañante, y el comportamiento individual de la yegua ante el macho. Las yeguas receptivas

fueron servidas mediante monta natural dirigida, con un padrillo mestizo de fertilidad comprobada. Las yeguas era cubiertas mediante monta natural supervisada a corral, y permanecían con el padrillo hasta la verificación de la ovulación. En las yeguas servidas se continuó con los controles ecográficos y las extracciones de sangre dos veces por semana, y a los 12-14 días del diagnóstico de la ovulación se realizó el diagnóstico de gestación mediante ecografía. Esta gestación se denominó **segunda concepción**. Las yeguas gestantes continuaron siendo revisadas semanalmente, y las no gestantes fueron servidas en el siguiente celo.

Muestras sanguíneas y análisis hormonales.

Al momento de la inducción del aborto se extrajo sangre para medir concentración sérica de eCG (concentración pre-aborto). El muestreo se continuó a un régimen de dos veces por semana, coincidiendo con los exámenes ginecológicos. Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción yugular, y la sangre fue colocada en tubos secos. Fueron mantenidas a temperatura ambiente por aproximadamente 3 horas para favorecer la coagulación. Luego fueron centrifugadas a 500g por 10 minutos, y el suero fue separado y almacenado en tubos Eppendorf a -20°C para posterior análisis. Para el procesamiento y almacenamiento de las muestras de sangre se utilizó el equipamiento y las instalaciones del laboratorio del campo experimental nº 1 de la Facultad de Veterinaria.

Análisis de las muestras

Para medir la concentración de eCG, se utilizó un test de ELISA cuantitativo (PMSG-ELISA, DRG Instruments, Marburg, Germany). Los análisis fueron realizados en un laboratorio de propiedad privada que realiza periódicamente determinaciones de eCG. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 3.8% y 4.6% respectivamente.

Las yeguas que presentaron > 35 UI/ml de eCG el día de la inducción fueron consideradas como de alto nivel de eCG (AN), mientras que en las que se verificó concentración ≤ 35 UI/ml se clasificaron como de bajo nivel (BN).

Análisis estadístico

Para todos los cálculos se utilizó el software de análisis estadístico Prism 6 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA). Se utilizó ANOVA para comparar el intervalo 1ª concepción-1ª ovulación post aborto con el intervalo 1ª concepción-2ª concepción y para comparar concentraciones de eCG entre grupos (ovulación/no ovulación, gestación/no gestación). Se realizó Chi cuadrado para comparar tasas de ovulación y gestación entre grupos BN y AN. Para investigar correlación entre la concentración de eCG pre-aborto con el intervalo 1ª concepción-1ª ovulación post aborto, y con intervalo 1ª concepción-2ª concepción, se utilizaron coeficientes de correlación de Pearson. Niveles de significación por debajo de 0,05 se consideran significativos. Valores entre 0,05 y 0,1 indican tendencia.

RESULTADOS

En el examen realizado 48 horas después de la maniobra de inducción del aborto, se encontró que el 96% de las yeguas (21/22) habían abortado, y completado la expulsión del feto y sus membranas. En la única yegua que permaneció preñada la maniobra se repitió al momento del examen, y el aborto fue evidente en la siguiente revisión realizada 72 horas después. No se encontraron signos de enfermedad sistémica ni uterina en ninguna yegua luego del aborto.

Al día cero de nuestro experimento y previo a la inducción del aborto, momento correspondiente al día $72,7 \pm 1.8$ de la primera gestación de las yeguas (rango de 70 a 77 días), se encontraron concentraciones variadas de eCG, con una media de $31,7 \text{ UI/ml} \pm 28.1 \text{ UI/ml}$ (rango de 0,81 a 86,63 UI/ml). La distribución de las yeguas según la producción de eCG al momento de la inducción del aborto se muestra en la Fig. 1.

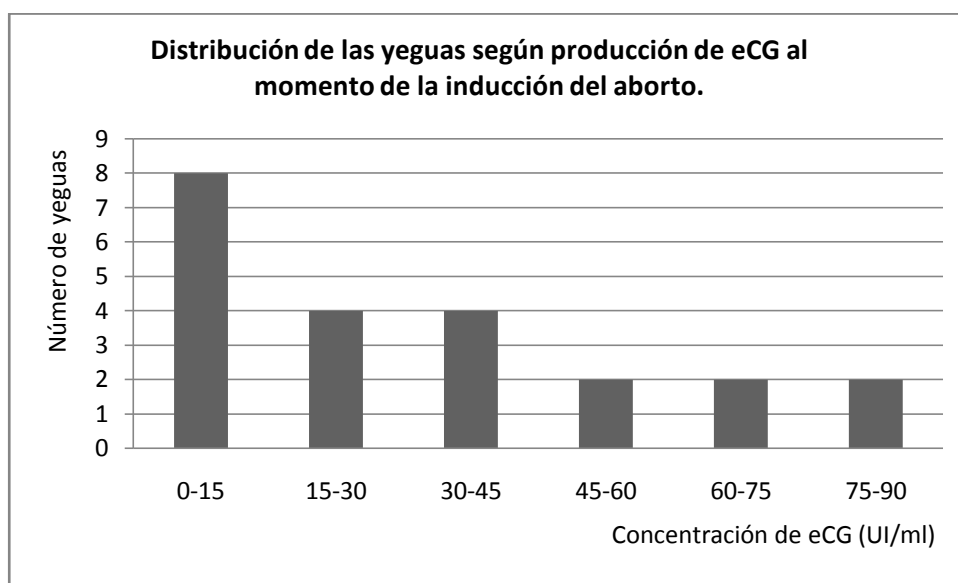


Fig. 1: Distribución de las yeguas según la producción de eCG al momento de la inducción del aborto.

Todas las yeguas mostraron concentraciones decrecientes de eCG a lo largo del experimento y alcanzaron concentraciones de 0 UI/ml antes del final del mismo. En promedio, las yeguas alcanzaron la concentración 0 en $24,5 \pm 19,2$ días post aborto (rango 4 a 67 días) correspondiente al día $97,5 \pm 19,3$ días post primera concepción (rango 78 a 139). Los perfiles de eCG de las diferentes yeguas se muestran en la Fig. 2.

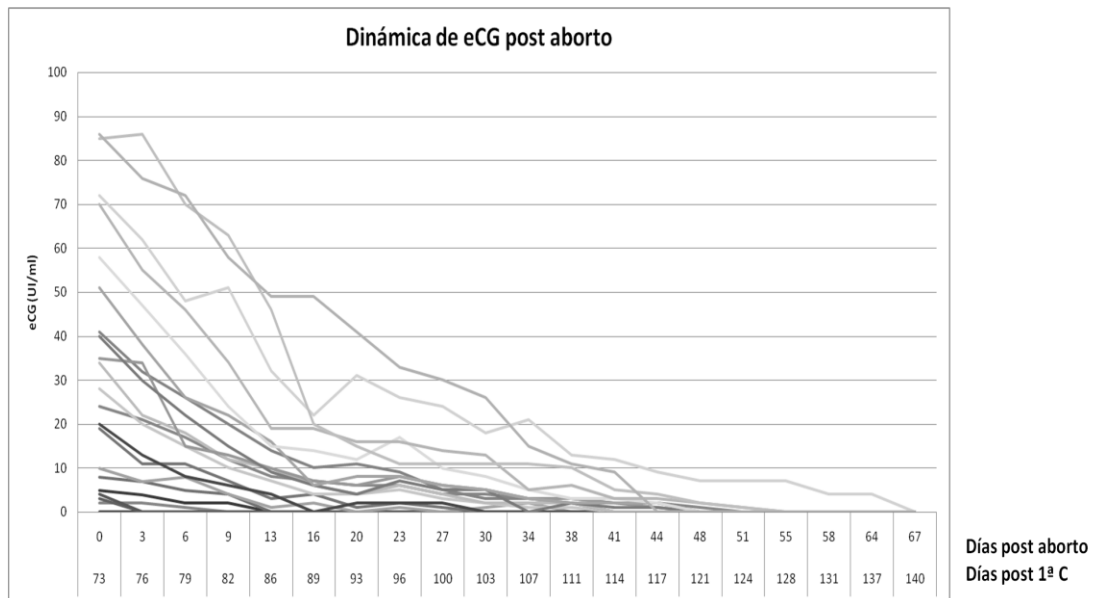


Fig.2 Dinámica de eCG luego del aborto.

Ovulación

El 50% de las yeguas (11/22) no volvió a ovular en los 70 días posteriores al aborto, período correspondiente a los días 70 a 140 de la primer gestación. Dentro de este grupo, el 55% (6/11) no mostró actividad ovárica hasta el final del experimento. Los ovarios de estas yeguas se mantuvieron pequeños, firmes, y sin crecimiento folicular significativo. Los úteros permanecieron flácidos y sin edema. Sólo una de éstas yeguas produjo un cuerpo lúteo secundario inmediatamente después del aborto (observado en el examen 48 horas post aborto) pero no tuvo otra actividad reproductiva desde entonces. El 45 % (5/11) de las yeguas tuvo cierta actividad ovárica, desarrollando folículos de más de 15 mm, pero no llegó a ovular durante el experimento.

El restante 50% de la yeguas (11/22) mostró desarrollo folicular luego del aborto, y ovuló al menos una vez durante el experimento. Todas las yeguas que ovularon presentaron comportamiento previo de estro, y 10 de 11 presentaron edema uterino concurrente. Los datos sobre el momento de ocurrencia de la ovulación se detallan en la Tabla 1.

Cuatro yeguas ovularon dos veces durante el experimento. Los datos sobre los momentos de ovulación de estas yeguas se detallan en la Tabla 2. El intervalo entre primer y segundo ciclo fue en promedio de $18,2 \pm 6,5$ días (rango 12 -29 días).

Dos yeguas mostraron señales externas de celo y aceptación de monta sin presencia de un folículo dominante, (una tenía un folículo de 200 mm que regresó, y la otra uno de 200 mm que ovuló 13 días después).

Tabla 1: Intervalos hasta la primera ovulación y segunda concepción.

Intervalo	Media \pm DS (días)	Rango	p
Aborto-1ª ovulación	34,4 \pm 9,8	11-60	
Aborto-2ª concepción	41,3 \pm 9,2	28-60	
1ª concepción-1ª ovulación	107,5 \pm 9,6	85-119	p=0,08
1ª concepción -2ª concepción	114,6 \pm 8,2	105-131	

Tabla 2: Datos sobre las yeguas que ovularon dos veces.

	Días desde al aborto		Días desde la primera concepción	
	Media \pm DS	Rango	Media \pm DS	Rango
1ª ovulación	25 \pm 11,9	11-38	99,5 \pm 11,5	85-110
2ª ovulación	43,2 \pm 13,6	28-60	117,5 \pm 12,5	105-131

La concentración pre-aborto de eCG fue significativamente menor ($p=0,007$) en yeguas que ovularon (Tabla 3 y Fig. 3). No se encontró una correlación entre la concentración de eCG al momento del aborto y el intervalo 1ª concepción-1ª ovulación ($r^2= 0,03$; $p=0,5797$) (Fig. 3). Todas las yeguas que ovularon presentaron ≤ 2.9 UI/ml de eCG al momento de la ovulación. Se observaron diferencias significativas en las tasas de ovulación ($p=0,0237$) entre yeguas BN ($n=14$) y yeguas AN ($n=8$). Mientras que el 71,4% de las yeguas de baja producción ovuló, sólo el 12,5% de las de alta producción lo hizo.

Dentro de las yeguas que no ovularon, las yeguas que entraron en anestro profundo presentaban, al momento de la inducción del aborto, una concentración promedio de eCG de $57,2 \pm 21,5$ UI/ml de eCG. Las que presentaron desarrollo folicular pero no ovularon, presentaban una concentración promedio de eCG de $35 \pm 35,1$ de eCG. Sin embargo, no hay diferencias significativas entre estos dos resultados ($p>0,05$)-

Tabla 3. Concentraciones pre-aborto de eCG en diferentes grupos.

	eCG (UI/ml)		
	Media \pm DS	Rango	Probabilidad
Ovulación	16,4 \pm 16,6	0,0-51,1	P=0,007
No ovulación	47,1 \pm 29,3	3,0-86,6	
2ª concepción	12,9 \pm 12,6	0,0-35	P=0,002
Sin 2ª concepción	47,4 \pm 28,0	3,0-86,6	

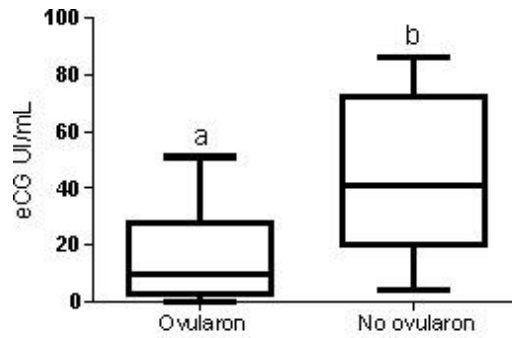


Fig. 3: Concentración de eCG al momento de inducción del aborto en yeguas que ovularon y no ovularon. ^{a,b} indican diferencia significativa ($p=0.067$).

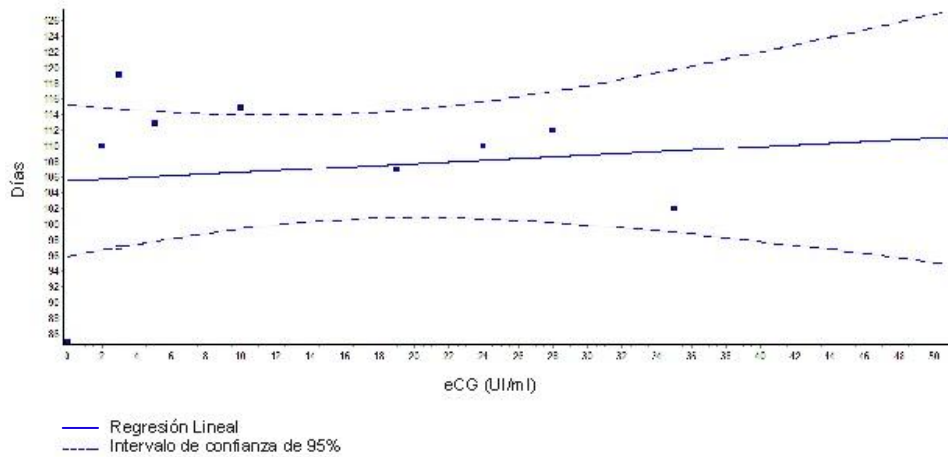


Fig.4: Diagrama de dispersión entre duración del intervalo 1ª gestación-1ª ovulación y concentración de eCG al aborto.

Concepción

Del total de las yeguas, el 45,5 % (10/22), concibió durante el experimento (correspondiente al 90,9% (10/11) de las yeguas que ovularon). Los datos sobre los intervalos hasta la segunda concepción se detallan en la Tabla 1. De las 10 yeguas que concibieron, el 60% lo hizo en su primera ovulación luego del aborto, y el 40% en la segunda. Las yeguas que concibieron en su segunda ovulación lo hicieron porque fueron servidas en el primer ciclo y no gestaron (50%) o porque por razones de manejo no fueron cubiertas en su primer ciclo (50%). Las dos yeguas que fueron cubiertas y no gestaron presentaban concentraciones de eCG de 1,80 y 2,90 UI/ml respectivamente.

La concentración de eCG al momento del aborto fue significativamente menor ($p= 0,002$) en yeguas que gestaron (Tabla 3 y Fig. 5). Se encontró una correlación positiva entre la concentración de eCG al aborto con la duración del intervalo 1ª concepción-2ª concepción ($r^2=0,40$; $p=0,0498$) (Fig. 6). De las 10 yeguas

que concibieron nuevamente, al momento de la concepción 8 presentaban concentraciones de eCG de menores a 0,5 UI/ml (rango 0,0 a 0,5 UI/ml) y las dos restantes presentaban 1,25 y 1,4 UI/ml respectivamente.

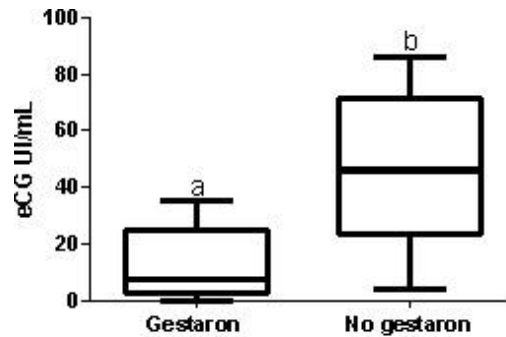


Fig.5: Concentración de eCG al momento de inducción del aborto en yeguas que gestaron y no gestaron ^{a,b} indican diferencia significativa ($p=0,002$).

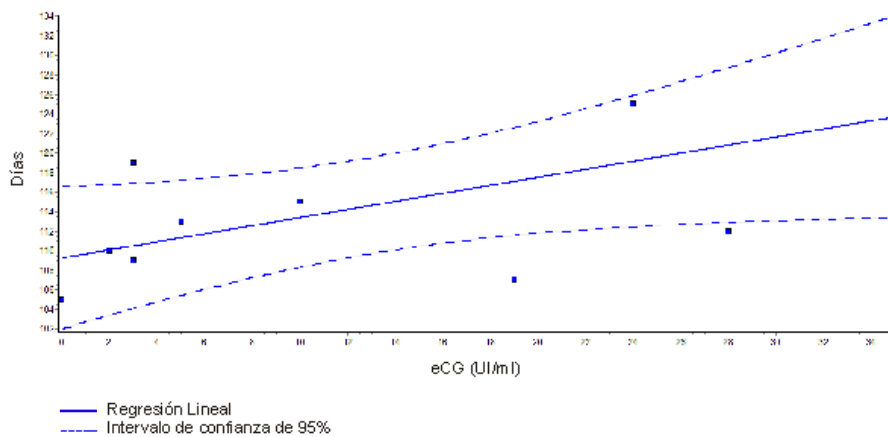


Fig.6: Diagrama de dispersión entre duración del intervalo 1ª concepción-2ª concepción y concentración de eCG a la inducción de aborto

Se observaron diferencias significativas en las tasas de gestación ($p=0,0017$) entre yeguas BN y AN. Mientras que el 71,4% de las yeguas BN gestaron (100% de las que ovularon), ninguna de las AN volvió a concebir durante el experimento.

El 13,6 % de las yeguas (3/22) desarrolló cuerpos lúteos suplementarios durante el experimento. Una de ellas con eCG de 19 UI/ml al momento de la inducción del aborto, cicló normalmente luego del desarrollo del CLS, ovuló y gestó. Otra yegua (eCG a la inducción de 72 UI/ml) desarrolló un CLS pocos días post aborto y luego entró en anestro. La tercera (eCG a la inducción de 58 UI/ml)

presentó desarrollo folicular durante el experimento, pero nunca ovuló, desarrollando estructuras lúteas anovulatorias en dos ocasiones.

Las yeguas del grupo control ciclaron regularmente durante toda la duración del experimento, y todas concibieron nuevamente. Ninguna yegua del grupo control presentó concentraciones medibles de eCG durante el experimento.

DISCUSIÓN

Todo el grupo de yeguas vacías al inicio del experimento cicló normalmente y volvió a concebir durante el estudio, no siendo afectadas negativamente por la estacionalidad (Ginther, 1992). Esto descarta que el anestro verificado en algunas de las yeguas del grupo abortado se haya producido por efectos de la estación.

Observamos una gran variabilidad entre yeguas en la concentración sérica de eCG al momento del aborto, en concordancia con lo que se ha descrito tradicionalmente (Wilsher y Allen, 2011; Murphy, 2012). Los valores observados para el día 70 son similares a los reportados por Cuervo Arango et al. (2015). Como medimos eCG únicamente a partir del día 70, y encontramos, de allí en adelante, concentraciones decrecientes de la hormona en todas las yeguas, sabemos que el pico máximo de producción probablemente ocurrió antes del día 70, y esto está acorde con lo descrito en la bibliografía (Allen, 1975), pero no podemos determinar el momento exacto en que se produjo, ni cuál fue la máxima cantidad producida por cada yegua. Es de destacar la baja concentración de eCG encontrada en algunas yeguas al momento del aborto. Coincide con lo encontrado por otros autores (Cuervo Arango et al. 2015) y con lo afirmado por Allen (Wisher y Allen, 2009), quien sostiene que la eCG no es imprescindible para la manutención de la preñez.

En este estudio se comprueba que la ocurrencia de la ovulación es dependiente de la cantidad de eCG al momento del aborto. Se observó que la mayoría de las yeguas BN (≤ 35 UI/ml) ovuló. Varios autores han descrito que la concentración de eCG de cada yegua está relacionada con el comportamiento reproductivo posterior al aborto (Huber et al. 1993; Allen, 2003; Zent, 2003). Así, yeguas que han desarrollado pequeñas copas endometriales y por tanto bajos niveles de eCG, por ejemplo, menores a 30 UI/ml entre los días 40 y 80, con frecuencia retornan el estro luego de la luteólisis inducida por varias inyecciones de PG.

Del total de nuestro grupo de estudio, el 50% de las yeguas ovularon al menos una vez durante el experimento, y el eCG promedio de este grupo de yeguas fue menor a 30 UI/ml. Todas ellas demostraron comportamiento estral previamente a la ovulación, y sólo una de 11 yeguas no presentó edema uterino antes de ovular, y no concibió. Squires et al. (1980) encontraron que el 100% las yeguas ovularon al menos una vez luego del aborto inducido por inyección de cloprostenol en diferentes regímenes comenzando al día 70 de gestación. Este mayor porcentaje puede deberse a la luteólisis inducida por las repetidas inyecciones de PG. Cuervo Arango et al. (2015) observaron que el 56,3 % de las yeguas volvía a ovular luego del aborto alrededor del día 65, con o sin ciclos anovulatorios previos. Este autor utilizó un método de inducción del aborto muy similar al utilizado por nosotros.

En yeguas con alto nivel de eCG al momento del aborto, más de 80 UI/ml, los ovarios se vuelven pequeños, duros y completamente inactivos, y la yegua entra en un anestro del que solo sale cuando se degeneran las copas endometriales (Allen, 2003). En nuestro estudio, el grupo de yeguas que entró en anestro con esas características fue el que presentó los valores más altos de eCG al aborto, y solamente una yegua de las 11 de nuestro grupo AN (>35 UI/ml) ovuló. Varios autores reportan porcentajes variables de yeguas que presentan inactividad completa luego del aborto (Squires, 1980; Aguilar et al. 2012; Cuervo Arango et al.

2015). El porcentaje encontrado por nosotros (27%) fue mayor que el encontrado por Cuervo Arango et al. 2015, que fue solamente de 6,2 %, pero similar el encontrado por Aguilar et al. en (2012), que fue de 27,9%.

El intervalo aborto-1ª ovulación reportado para yeguas que pierden su gestación entre los días 60-70 es variable de 12,4 a 51,4 días (Squires et al. 1980; Aguilar et al. 2012; Cuervo Arango et al. 2015). En nuestro trabajo este intervalo fue similar a lo encontrado por los autores mencionados, y para el total de las yeguas que ovularon al menos una vez, la primera ovulación ocurrió en promedio 34 días luego del aborto (rango 11 a 60 días), correspondiente a 107 días luego de la primera concepción (rango 85 a 119 días). A esa altura de la primera gestación, se estaría entrando dentro del período reportado como de normal degradación de las copas endometriales y de la desaparición de la eCG de la circulación (Wilsher y Allen, 2011).

Observamos un umbral en la concentración de eCG (2,9 UI/ml) por debajo del cual las yeguas son capaces de ovular. Este resultado es también semejante a lo descrito por otros autores (Huber et al., 1993; Cuervo Arango et al., 2015). De todas formas, la ovulación no se produce inmediatamente luego de atravesado este umbral, sino que tarda un tiempo variable en ocurrir. Las yeguas que tienen más eCG al momento del aborto demoran más en alcanzar la concentración umbral. La variabilidad en el tiempo que tarda en ocurrir la ovulación luego de alcanzado dicho umbral contribuye a explicar la ausencia de correlación entre la eCG al momento del aborto y el intervalo 1ª gestación-1ª ovulación.

Con respecto a la capacidad de volver a concebir, encontramos que ninguna yegua con producción >35 UI/ml al momento de la inducción del aborto volvió a quedar preñada, mientras que la mayoría de las de ≤35 UI/ml lo hizo. No hemos encontrado otros autores que reporten una cantidad de eCG al momento del aborto por debajo de la cual las yeguas no vuelven a concebir en la misma temporada reproductiva.

Al servir yeguas con bajas concentraciones de eCG éstas pueden quedar preñadas nuevamente, y aparentemente las copas endometriales y la eCG remanentes no impiden el desarrollo embrionario ni la placentación en esta segunda gestación (Allen, 2003). Observamos que una vez cíclicas, la fertilidad de estas yeguas que han abortado es alta. De las 10 yeguas que concibieron durante nuestro experimento, 8 presentaban concentración de eCG menores a 0,5 UI/ml, y dos tenían 1,4 y 1,25 UI/ml respectivamente al momento de la concepción. Estos resultados son similares los descritos por otros autores (Huber et al., 1993; Cuervo Arango et al., 2015).

El intervalo 1ª concepción-2ª concepción observado por nosotros es similar al publicado por otros autores, y encontramos que tiende a ser mayor que el intervalo 1ª concepción-1ª ovulación. Esto puede explicarse porque ninguna de las yeguas que ovularon con concentraciones eCG entre 1,5 y 3 UI/ml concibió, lo cual probablemente se deba a fallas en la maduración de los oocitos por la presencia de eCG (Cuervo Arango et al., 2015).

Recientemente se planteó una controversia entre lo aceptado tradicionalmente, de que las yeguas que abortan en presencia de copas endometriales sólo vuelven a ovular cuando la eCG es indetectable (Allen 1975), y

lo que ocurre en explotaciones de transferencia embrionaria, en que las yeguas inducidas a abortar alrededor del día 60 son reutilizadas como receptoras poco tiempo después (Aguilar et al. 2012, Cuervo Arango et al.,2015). En nuestro trabajo observamos que, en concordancia con lo propuesto originalmente por Allen, las yeguas sólo ovularán por debajo de un cierto umbral de eCG, y sólo concebirán cuando las concentraciones de la hormona son cercanas a cero. El tiempo en que las yeguas alcanzan estos valores de eCG es, como ya se sabe, extremadamente variable, y dependerá de la concentración de eCG al momento del aborto y del momento en la gestación en que el aborto se produce. En los centros de transferencia, lo que ocurre probablemente es que se transfiere embriones a las yeguas que alcanzan antes estas bajas concentraciones. Debe tenerse en cuenta la diferencia entre la capacidad de concebir propiamente dicha, y la de recibir un embrión, en que la ovulación no es un evento imprescindible, por lo que yeguas abortadas que no han ovulado pero que cumplen con ciertos criterios pueden ser reutilizadas como receptoras.

Para ampliar al alcance de nuestro trabajo, hubiera sido útil medir las concentraciones circulantes de progesterona, lo cual nos habría ayudado a definir técnicamente los ciclos, y a evaluar la regresión de los cuerpos lúteos secundarios presentes al momento del aborto y a los generados a posteriori de éste, y a estudiar la influencia de éstas estructuras sobre la dinámica folicular de nuestras yeguas. También habría sido útil una determinación más detallada del número de estructuras lúteas presentes en los ovarios de las yeguas al momento del aborto, y su relación con la cantidad de eCG en dicho momento. Consideramos, de todas formas, que estas carencias no invalidan nuestro trabajo, y que los objetivos del estudio, centrados en el estudio de la eCG, se cumplieron.

CONCLUSIONES

Confirmando nuestra hipótesis, se concluye que luego de la interrupción de la gestación entre los días 70 y 77, yeguas con baja producción (≤ 35 IU/ml) de eCG tienen mayores tasas de ovulación y concepción que yeguas con alta producción de eCG (> 35 IU/ml). Ante un aborto en presencia de copas endometriales, medir la concentración de eCG puede ayudar a establecer un pronóstico sobre el futuro comportamiento reproductivo de esa yegua para el resto de la temporada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams, A.P.; Antczak, D.F. (2001) Ectopic transplantation of equine invasive trophoblast. *Biol Reprod*; 64:753–63.
2. Adams, A.P.; Oriol, J.G.; Campbell, R.E.; Oppenheim, Y.C.; Allen, W.R.; Antczak, D.F. (2007) The effect of skin allografting on the equine endometrial cup reaction. *Theriogenology* 68: 237–247.
3. Papkoff, H. (1981) Studies on the disappearance of equine chorionic gonadotropin from the circulation in the rat: tissue uptake and degradation. *Endocrinology*. 109(4):1242-7.
4. Aguilar, J.; Luzuriaga, I.; Pardo Chavero, V.; Leaniz, J.; Casale, P.; Carboneti, I.; Marino, V. (2012). Interruption of gestation and reuse of recipient mares in a commercial embryo transfer program. 8th ISEET Abstracts / *Journal of Equine Veterinary Science* 32: 397-422.
5. Allen, W.R. (1969) Factors influencing pregnant mare serum gonadotrophin production. *Nature* 223, 64-66.
6. Allen, W.R. (1970). *Equine gonadotrophins*. Tesis PhD, University of Cambridge.
7. Allen, W.R.; Hamilton, D.W.; Moor, R.M. (1973). The origin of equine endometrial cups. II. Invasion of the endometrium by trophoblast. *Anat Rec* 177:485–501.
8. Allen, W.R.; Kydd, J.H.; Boyle, M.S.; Antczak, D.F. (1987). Extraspecific donkey-in-horse pregnancy as a model of early fetal death. *J Reprod Fertil Suppl* 35:197–209.
9. Allen, W.R. (1994) Use of laser surgery to ablate endometrial cysts, endometrial cups and transluminal adhesions in the uteri of mares. *ARS Veterinaria*. Vol 10 (2): 59-66.
10. Allen, W.R.(2001). Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction* 121:513-27.
11. Allen, W.R.; Wilsher S.; Stewart, F.; Ousey, J.; Fowden, A. (2002). The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. *Endocrinology of pregnancy J Endocrinol* 172: 237-246.
12. Allen, W.R. (2003) Development and functions of the equine placenta. En: *Proceedings of a workshop on the equine placenta*. Agricultural Experiment Station. College of Agriculture. University of Kentucky. Lexington, Kentucky, USA. pp 20-33.

13. Allen, W.R. (2005) Maternal recognition and maintenance of pregnancy in the mare. *Anim Reprod* 2(4) 209-223.
14. Allen, W.R.; Wilsher, S. (2009). A Review of Implantation and Early Placentation in the Mare *Placenta* 30: 1005–1015.
15. Allen, W.R.; Wilsher, S.(2012) Persistent endometrial cups in the same mare in two successive pregnancies *Case Report Equine vet Educ* 24 (5): 247-250.
16. Antczak, D.F.; de Mestre, A. M.; Wilsher, S.; Allen W.R. (2012) The Equine Endometrial Cup Reaction: A Fetomaternal Signal of Significance. *Annu Rev Anim Biosci* 2013 (1):419–442.
17. Bartlett, A.; Pain, S.J.; Hughes, P.E.; Stott, P.; van Wettere, W.H. (2009). The effects of PG600 and boar exposure on oestrus detection and potential litter size following mating at either the induced (pubertal) or second oestrus. *Anim Reprod Sci* 114:219-227.
18. Baruselli, P.S.; Ferreira, R.M.; Sá Filho, M.F.; Nasser, L.F.T.; Rodrigues, C.A.; Bo, G.A. (2010). Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. *Reprod Fertil Dev* 22:67-74.
19. Bell, R.J.; Bristol, F. (1991).Equine chorionic gonadotrophin in mares that conceive at foal oestrus. *J Reprod Fertil Suppl* 44:719–21.
20. Bergelt, D.R. (2009). Anatomy and physiology of the mare. En: Samper, J.C. (Ed.), *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. 2^a Ed. Saunders-Elsevier. St. Louis, pp. 113–131.
21. Bo, G.A.; Baruselli, P.S.; Martinez, M.F. (2003). Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci* 78:307-326.
22. Boeta, M.; Zarco, L. (2005). Progesterone and Equine Chorionic Gonadotropin Concentrations Around the Time of Pregnancy Loss in Mares Impregnated by Donkeys or Stallions. *Journal of Veterinary Science*, 25:12. 531-538.
23. Boeta, M.; Zarco, L. (2012). Luteogenic and luteotropic effects of eCG during pregnancy in the mare. *Animal Reproduction Science* 130:57-62.

24. Böttcher, D.; Gräfe, H.; Zimmermann, G.; Alexander, H.; Ellenberger, C.; Schoon, H.A. (2014) Transcription of equine chorionic gonadotropin/luteinizing hormone subunit gene in the endometrium of non-pregnant mares. *Pferdeheilkunde*30(1):19-25.

25. Brosnahan, M.M.; Miller, D.C.; Adams, M.; Antczak, D.F. (2012) IL-22 is expressed by the invasive trophoblast of the equine (*Equus caballus*) chorionic girdle. *J Immunol*188:4181–4187.

26. Cole, H.H.; Bigelow, M.; Finkel, J.; Rupp, G.R.(1967).Biological half-life of endogenous PMSG following hysterectomy and studies on losses in urine and milk. *Endocrinology*81:27–30.

27. Chopineau, M.; Martinat, N.; Troispoux, C.; Marichatou, H.; Combarous, Y.; Stewart, F.; Guillou, F. (1997) Expression of horse and donkey LH in COS-7 cells: evidence for low FSH activity in donkey LH compared with horse LH. *J Endocrinol* 152:371–7.

28. Cuervo-Arango, J.; Aguilar, J.J.; Vettorazzi, M.L.; Martínez-Boví, R.(2015).eCG concentrations, luteal structures, return to cyclicity, and postabortion fertility in embryo transfer recipient mares.*Theriogenology*84(6):1003-1013.

29. Daels, P.F.; Albrecht, B.A.; Mohammed H.O. (1998). Equine Chorionic Gonadotropin Regulates Luteal Steroidogenesis in Pregnant Mares. *Biology of Reproduction* 59: 1062–1068 .

30. de Mestre, A.; Noronha, L.; Wagner, B.; Antczack, D.F. (2010)Split Immunological Tolerance to Trophoblast. *Int J Dev Biol.* 54(2-3): 445–455.

31. de Mestre, A.M.; Antczak, D.F.; Allen W.R. (2011). Equine Chorionic Gonadotrophin (eCG). En: *Equine Reproduction* (2011).Ed: Mc Kinnon, O.A., Squires, E.L.; Vaarner, D.D.; Vaala, W.E .2º Ed. Blackwell publishing Ltd. Iowa, USA. Capítulo 172. pp 1648-1668.

32. Ferreira J.I.; Freire, H.; Kalpokas, I. (2005)Determinación de los niveles plasmáticos de eCG en yeguas a partir del aborto inducido al día 70 de gestación. Tesis de Grado Facultad de Veterinaria. UDELAR. 38pp. Disponible mediante solicitud desde <http://www.sidalc.net/cgibin/wxis.exe/?IsisScript=SIBURFV.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=008245>

33. Flaminio, M.J.B.F; Antczak, D. F. (2005). Inhibition of lymphocyte proliferation and activation: a mechanism used by equine invasive trophoblast to escape the maternal immune response. *Placenta* 26:148-159.

34. Gerstenberg, C.; Allen, W.R.; Stewart, F. (1999). Factors controlling epidermal growth factor EGF gene expression in the endometrium of the mare. *Mol Reprod Dev* 53: 255-265.
35. Ginther, O.J.(1992) *Reproductive Biology of the mare: basic and applied aspects*. Ed. Equiservices. 2^o ed. Wiscosin.

36. Huber M.J.; Roser, J.F.; Riebold, T.W.; Schmotzer, W.B.; Grubb, T.L.; Crisman, R.O.(1993) Effect of surgical removal of endometrial cups on concentrations of chorionic gonadotrophin and subsequent fertility in the mare. *Equine Vet J.* 25(2):110-4.

37. Jeffcott L.B.; Hyland, J.H.; MacLean, A,A.; Dyke, T. and Robertson-Smith, G. (1987) Changes in maternal hormone concentrations associated with induction of fetal death at day 45 of gestation in mares. *J Reprod Fertil Suppl.* 35:461-7.

38. Legardinier, S.; Klett, D.; Poirier, JC.; Combarous, Y.; Cahoreau, C. (2005) Mammalian-like nonsialyl complex-type Nglycosylation of equine gonadotropins in Mimic insect cells. *Glycobiology* 15:776–90.

39. Lofstedt, R.M. (1986) Termination of unwanted pregnancy in the mare. En: *Morrow DA.Current therapy in theriogenology*.2^a Ed.Philadelphia, WB Saunders Co.pp.715 – 718.

40. Macpherson, M.L.; Reimer, J.M. (2000). Twin reduction in the mare: current options. *Animal Reproduction Science* 60–61:233–244.

41. Malschitzky ,E.; Schilela, A.; Silva Meirelles, L.; Gelpi Mattos, A.L.; Gregory, R.M.; Mattos, R.C. (2001) Artificial photoperiod in pregnant mares and its effect on pregnancy length and postpartum reproductive performance. *Plerdeheilkunde* 17:6, pp 565-569

42. Martinuk, S.D.; Bristol, F.; Murphy, B.D.(1990). Effects of the dam on equine chorionic gonadotropin concentrations during pregnancy. *Domest Anim Endocrinol*7:551-557.

43. Martinuk, S.D.; Manning, A.W.; Black, W.D.; Murphy, B.D.(1991) Effects of carbohydrates on the pharmacokinetics and biological activity of equine chorionic gonadotropin in vivo. *Biol Reprod*45:598-604.

44. Mönke, U. and Franz, A. (1985) Investigations on the sex ratio of horse embryos and its importance for PMSG production in mares. *Anim. Breed. Abstr.* 53, Abstract 7359.

45. Morris, L.H.A. ; Allen, W.R. (2002) Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. *Eq vet J* 34 (1):51-60.
46. Murphy, B.D. (2012). Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Anim Reprod* 9(5):223-230.
47. Noronha, L.E.; Huggler, K.E.; de Mestre, A.M.; Miller, D.C.; Antczak, D.F.(2012)Molecular evidence for natural killer-like cells in equine endometrial cups.*Placenta*33(5):379-386.
48. Penzhorn, B.L.; Bertschinger, H.J.; Coubrough R.I. (1986).Reconception of mares following termination of pregnancy with prostaglandin F2 alpha before and after day 35 of pregnancy. *Equine Vet J.* 18(3):215-217.
49. Raggio, I.; Lefebvre, R.C.; Poitras, P.; Vaillancourt, D.; Goff, A.K.(2008) Twin pregnancy experimental model for transvaginal ultrasound-guided twin reduction in mares. *Can Vet J.*49(11): 1093–1098.
50. Rathwell, A.C.; Asbury, A.C.; Hansen, P.J.; Archbald, L.F.(1987) Reproductive function of mares given daily injections of prostaglandin F2alpha beginning at day 42 of pregnancy. *Theriogenology.* 27(4):621-30.
51. Rimington, C.; Rowlands, I.W.(1844) Serum gonadotrophin. 2. Further purification of the active material. *Biochem J* 38:54–60.
52. Saint-Dizier, M.; Foulon-Gauze, F.; Lecompte, F.; Combarous, Y.; Chopineau, M. (2004). Cloning and functional expression of the equine luteinizing hormone/chorionic gonadotrophin receptor. *J Endocrinol* 183:551-559.
53. Squires, E.L.; Hillman, R.B.; Pickett, B.W.; Nett, T.M. (1980). Induction of abortion in mares with equimate: effect on secretion of progesterone, PMSG and reproductive performance. *J Anim Sci.* 50(3):490-5.
54. Steiner, J.; Antczak, D.F.; Wolfsdorf , K.; Saville, K.; Brooks, S.; Miller, D.; Bailey C.; Zent, W.(2006) Persistent endometrial cups. *Anim Repro Sci* 94: 274–275.
55. Stewart, F.; Allen, W.R.; Moor, R.M. (1977) Influence of fetal genotype on the follicle-stimulating hormone: luteinising hormone ratio of pregnant mare serum gonadotrophin. *J Endocrinol* 73:419–25.
56. Stewart, F.; Allen, W.R.;(1981) Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. *J Reprod Fertil.* 62:527–36.
57. Stewart, F.; Power, C.A.; Lennard, S.N.; Allen, W.R.; Amet, L.; Edwards, R.M. (1994). Identification of the horse epidermal growth factor (EGF) coding sequence and its use in monitoring EGF gene expression in the endometrium of the pregnant mare. *J Mol Endocrinol*;12:341–50.

58. Stewart, F.;Lennard, S.N.;Allen, W.R. (1995). Mechanisms controlling formation of the equine chorionic girdle. *Biol Reprod Monogr* 1:151–9.
59. Sugino, H.; Bousfield, G.R.; Moore, W.T. Jr.; Ward, D.N.(1987). Structural studies on equine glycoprotein hormones. Amino acid sequence of equine chorionic gonadotropin beta-subunit. *J Biol Chem* 262:8603-8609.
60. Urwin, V.E.; Allen, W.R. (1982) Pituitary and chorionic gonadotrophic control of ovarian function during early pregnancy in equids. *J Reprod Fertil Suppl* 32:371–81.
61. Volkmann,D.; Zent,W.; Little, T.; Riddle, T.; Durenbereger, J.; Potenza,K.; Sibley L.; Roser, J. (2008). Hormone Profiles of Mares Affected by the Mare Reproductive Loss Syndrome. *Reprod Dom Anim* 43: 578–583
62. Wilsher, S.; Allen, W.R. (2011). Factors influencing equine chorionic gonadotrophin production in the mare. *Eq Vet J.* 43 (4) : 430–438.
63. Wolfsdorf, K.E. (2006) Management of Postfixation Twins in Mares. *Vet Clin Equine* 22: 713–725.
64. Wooding, F.B.; Morgan, G.; Fowden, A.L.; Allen, W.R. (2001) A structural and immunological study of chorionic gonadotrophin production by equine trophoblast girdle and cup cells. *Placenta.* 22(8-9):749-67.
65. Zent, W. W. (2003) An Overview of Reproductive System Changes during and after Mare Reproductive Loss Syndrome. *Proceedings of the First Workshop on Mare Reproductive Loss Syndrome, 2003.* Kentucky Agricultural Experiment Station, Lexington, Kentucky. pp30-31.