

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE eCG EN YEGUAS A
PARTIR DEL ABORTO INDUCIDO AL DÍA 70 DE GESTACIÓN**

Por

Juan Ignacio FERREIRA

Horacio FREIRE

Irene KALPOKAS

TRABAJO FINAL presentado como uno de los
requisitos para obtener el título de Doctor en
Ciencias Veterinarias

(Orientación Salud Animal)

MONTEVIDEO

URUGUAY

2005

024 TG
Determinación d
Ferreira, Juan Ignacio



FV/26507

TRABAJO FINAL aprobado por:

Presidente de Mesa:

Dr. Daniel Elhordoy
Nombre completo y firma

Segundo Miembro (Tutor):

Dr. Fernando Perdigón
Nombre completo y firma

Tercer Miembro:

Dr. Fernando Camps
Nombre completo y firma

Fecha:

28 de octubre de 2005

Autores:

Juan Ignacio Ferreira Silveira

Nombre completo y firma

Horacio Alejandro Freire Clivio

Nombre completo y firma

Irene Kalpokas Tognazzolo

Nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Fernando Perdigón, Daniel Elhordoy, Fernando Camps, Eduardo Rosso (Depto. de Ventas de Nutritec – Grappiolo & Cía. S.A.) Lucy Sosa, Oscar Ferreira (y a Gabriela), Andrés Gil, Daniel Cavestany, Teresa Sala.

Al personal del Depto. de Documentación y Biblioteca de la Facultad de Veterinaria.

Al personal del establecimiento “Las Marquesas”.

A nuestras familias y amigos.

Tabla de contenidos

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	V
1. <u>RESUMEN</u>	1
2. <u>SUMMARY</u>	1
3. <u>INTRODUCCIÓN</u>	2
4. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
4.1 GONADOTROFINA CORIÓNICAS EQUINAS (eCG).....	3
4.1.1 <u>Fuente de la eCG</u>	4
4.1.2 <u>Desarrollo de la faja coriónica</u>	5
4.1.3 <u>Estructura y desarrollo de las copas endometriales</u>	8
4.1.4 <u>Funciones y características fisicoquímicas de la eCG</u>	10
4.1.5 <u>Dinámica de la eCG y factores que influyen en su producción</u>	12
4.1.6 <u>Rol de la eCG en la yegua</u>	13
4.2 <u>DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN MEDIANTE PALPACIÓN RECTAL</u>	14
4.3 <u>MEDICIÓN DE eCG COMO DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN</u>	15
4.4 <u>DINAMICA DE LA eCG LUEGO DE LA PÉRDIDA DE LA GESTACIÓN</u>	15
4.4.1 <u>Persistencia de copas endometriales</u>	17
4.5 <u>INTERRUPCIÓN DE GESTACIÓN POR MANIOBRA MANUAL</u>	18
4.6 <u>INTERRUPCIÓN DE GESTACIÓN POR ADMINISTRACION DE PROSTAGLANDINA O ANÁLOGOS</u>	18
4.6.1 <u>Mecanismo de acción de la prostaglandina o análogos</u>	19
5. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	21
5.1 ANIMALES.....	21
5.2 TRATAMIENTOS.....	21
5.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	22
5.4 ANÁLISIS HORMONAL.....	22
5.5 OBSERVACIONES Y MANIOBRAS DE DIAGNÓSTICO.....	22
5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	23
6. <u>RESULTADOS</u>	23
7. <u>DISCUSIÓN</u>	26
8. <u>CONCLUSIONES</u>	28
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	29

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Figura 1. Concentraciones medias de eCG comparadas de los Grupos I, II y Grupo control en función del tiempo.....	23
Figura 2. Regresiones lineales comparadas de los Grupos I, II y Grupo control.....	24
Cuadro 1. Regresión de los niveles hormonales por tratamiento (manual y hormonal) y días.....	25

1. RESUMEN

Se utilizaron 37 yeguas cruce preñadas, que fueron separadas en tres grupos: 15 fueron sometidas a la maniobra manual destinada a la interrupción de la gestación en el día 70-75; 16 fueron tratadas con un análogo de prostaglandina F_{2α} en la misma etapa de gestación y con el mismo propósito y 6 conformaron el grupo control y permanecieron preñadas. Se midieron las concentraciones de eCG mediante el método de ELISA durante los 20 días posteriores al aborto y de igual manera en el grupo control con el objetivo de determinar la dinámica de la hormona y evaluar la influencia del método de interrupción de preñez en la misma. Las concentraciones de la hormona en las yeguas control fueron mayores ($p < 0,05$) a las de las yeguas abortadas. No hubo diferencias entre ambos grupos tratados. Nuestros resultados confirman que ambos métodos son efectivos en la interrupción de la preñez y que la medición de eCG no es una herramienta fiable para diagnosticar gestación. En este trabajo los niveles de eCG fueron diferentes entre el grupo control y los grupos tratados, por lo tanto la inducción del aborto alteraría la dinámica de la eCG, sin embargo la hormona se mantuvo detectable en sangre durante todo el experimento.

2. SUMMARY

Thirty seven crossbred pregnant mares were allocated to three groups: in 15 of them, the manual procedure for the interruption of gestation in the day 70-75 of pregnancy was performed; 16 were treated with a prostaglandin F_{2α} analog at the same stage of gestation and with the same objective and 6 conformed the control group and remained pregnant. The eCG concentrations were measured by ELISA during the 20 days post abortion and in the same way as in the control group with the purpose of determining the dynamics of the hormone and evaluating the influence of the method in the eCG levels. The hormone concentrations in the control mares were greater ($p < 0.05$) than those of the aborted mares. There were no differences between both treated groups. Our results confirm that both methods are effective for the interruption of the pregnancy and that the measurement of eCG is not a trustworthy tool to diagnose gestation. In this work the levels of eCG were different between the control group and the treatment groups, therefore the induction of the abortion could alter the dynamics of eCG, although the hormone remained detectable throughout the whole experiment.

3.INTRODUCCIÓN

La eCG (gonadotropina coriónica equina) es una glicoproteína de alto peso molecular (70.000 Kda) secretada por estructuras glandulares llamadas copas endometriales. Denominada en su descubrimiento PMSG (gonadotropina sérica de la yegua preñada), esta hormona es detectable, inicialmente, sólo en la yegua preñada ya que su fuente se desarrolla únicamente en este estado fisiológico 35-40 días post concepción. La máxima capacidad de secreción hormonal por parte de las copas se alcanza a los 60-70 días de gestación, comenzando aquí a declinar hasta no ser detectada en el suero materno unos 80-90 días después.

Son varios los métodos disponibles para la cuantificación sérica de eCG, entre ellos están el RIA (radioinmunoanálisis) y el ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) siendo este último capaz de detectar y medir la hormona más tempranamente (35 días de gestación) (McKinnon, 1993).

La eCG posee actividad FSH y LH al ser administrada a otras especies domésticas diferentes a la equina. Ha sido utilizada para estimular el crecimiento folicular y ovulación en animales de granja y laboratorio en programas de sincronización de celo y, a dosis altas, en programas de transferencia embrionaria al inducir superovulación.

En la yegua manifiesta sólo el componente LH llevando al desarrollo de cuerpos lúteos accesorios que contribuyen a un aporte extra de progesterona para el mantenimiento de la gestación (Rowson, 1979; Saumande y Chupin, 1977 citados por Allen y Stewart, 1993).

Un hecho curioso en todo esto, es que si bien las células que producen eCG son de origen fetal, migran al endometrio para formar las copas. Esto hace que la muerte y expulsión fetal no afecte la fuente de la hormona, una de las razones por las que fue dejado de lado el nombre PMSG adoptándose el de eCG. La detección de eCG en el suero materno no siempre indica una gestación en curso.

La persistencia de la hormona luego de la pérdida de la preñez puede tener dos consecuencias; arrojar falsos positivos en diagnósticos de gestación (Allen, 1975; Squires y col., 1980; Lofstedt, 1986; Jeffcott y col., 1987; McKinnon, 1993; Ginther, 1998; Daels y col., 1991 citados por Allen, 2003) y fallar en retornar al estro en la misma temporada reproductiva (McKinnon, 1993). Como contrapartida, Douglas y col. (1974) observaron que yeguas inducidas a abortar con prostaglandina (PG) F2 α entre los días 80-90 de gestación mostraron celo y ovulación pocos días después del aborto. Según Lofstedt (1996), la terapia con PG no tendría efecto sobre la función de las copas endometriales y lo mismo sucedería con el aborto espontáneo. Fey y Douglas observaron que las concentraciones en plasma de eCG fueron menores en yeguas que abortaron que en aquellas yeguas que mantuvieron normalmente la gestación (Fey y Douglas citados por Jeffcott y col., 1987).

Las yeguas que desarrollan copas endometriales pequeñas con baja producción de eCG presentarán un estro ovulatorio verdadero luego del aborto y el servicio puede resultar en concepción y establecimiento de una segunda preñez; el desarrollo embrionario temprano y la placentación no son interferidos por las persistentes copas endometriales y los continuos bajos niveles de eCG en la sangre de la yegua (Allen, observaciones no publicadas citadas por Allen, 2003).

La interrupción de la gestación en la yegua, durante la etapa de producción de eCG, requiere repetidas inyecciones de PG F2 α o análogos (Varner y col., 1988; Kasman y



col., 1988 citados por Montavon y col., 1991). También puede lograrse por la penetración manual del tapón cervical y la dilatación del cérvix. Sin embargo, la fiabilidad de este método es pobremente documentada (Lofstedt, 1986). No hay información disponible acerca de si hay diferencias entre un método y otro en cuanto a la concentración de eCG post aborto.

En nuestro país no existen antecedentes de investigación acerca del comportamiento de la eCG luego de la interrupción de la preñez, así como tampoco existen trabajos respecto al uso de prostaglandina en la yegua.

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- Determinar, mediante el método de ELISA, la dinámica de la hormona eCG en yeguas posteriormente a la interrupción de una gestación de 70-75 días.
- Establecer la influencia del método de interrupción de gestación en la dinámica de la hormona.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Varias características de la preñez temprana equina parecen desarrollarse únicamente en el género *Equus* y son de considerable interés académico y práctico. Desde el momento de la fertilización hasta el establecimiento de una placenta funcional y madura, unos 150 días después, una serie de cambios morfológicos, inmunológicos y endocrinológicos toman lugar en el oviducto y útero. Presumiblemente, los mismos son importantes para el establecimiento y mantenimiento del estado de preñez pero difieren marcadamente de los eventos equivalentes de otras especies domésticas (Allen, 2000).

4.1 GONADOTROFINA CORIÓNICA EQUINA (eCG)

En 1930, en la Universidad de Davis, California, Cole y Hart descubrieron la existencia de una hormona presente en el suero de yeguas preñadas, que denominaron PMSG, llamada hoy eCG (gonadotrofina coriónica equina). Tres años antes, los obstetras alemanes Aschheim y Zondek habían publicado una investigación en donde mostraban que la orina y el suero de la mujer, durante el primer trimestre de gestación, contenían grandes cantidades de una hormona gonadotrófica. El descubrimiento de lo que luego sería llamada hCG, estimuló a los laboratorios de muchas partes del mundo a investigar al respecto. Los endocrinólogos inyectaron en animales de laboratorio, suero y orina de todo tipo de animales domésticos, preñados o no. Fue entonces, cuando Cole y Hart descubrieron la existencia de la hormona en el suero de la yegua preñada. La inyección de tan solo 0,1 ml. de suero crudo obtenido de una yegua preñada en el día 60 de gestación a una rata inmadura estimuló no solo el desarrollo de una onda folicular en los ovarios, acompañada del agrandamiento uterino y cambios citológicos vaginales inducidos por los estrógenos secretados por éstos folículos en maduración, sino que también estimuló la ovulación de dichos folículos y el desarrollo de un cuerpo lúteo maduro. Claramente, el suero de la yegua preñada contenía lo que parecía ser una mezcla de las hormonas FSH y LH (Allen y Stewart, 1993).

4.1.1 Fuente de la eCG

Cole y su grupo de investigadores descubrieron la fuente de eCG en la yegua preñada pero este descubrimiento no fue fácil (Allen y Stewart, 1993).

Catchpole y Lyons fueron asignados para localizar la fuente y demostrar el mecanismo de secreción de eCG a la luz de los descubrimientos publicados en ese entonces por Zondek, Phillip, Collip y otros quienes demostraron que la hCG en la mujer embarazada es producida por el componente fetal de la placenta (Zondek, 1930; Phillip, 1930; Collip, 1930 citados por Allen y Stewart, 1993). Catchpole y Lyons llevaron a cabo estudios por más de dos años recuperando úteros de yeguas preñadas, practicando disecciones y extrayendo muestras de tejido fetal placentario y endometrial de varias partes del útero. Luego midieron la actividad gonadotrófica mediante la adaptación de un método biológico previamente utilizado en ratas, encontrando mayores concentraciones de la hormona en los días 40-80 de gestación en el endometrio del cuerno uterino grávido en contacto directo con las membranas fetales en desarrollo, en comparación con el cuerno uterino no grávido. Más adelante, debido a que no identificaron específicamente la fuente de la hormona en las muestras de endometrio seleccionadas, encontraron una mayor actividad gonadotrófica en extractos de alantocorion que en los de endometrio. Ellos concluyeron que, al igual que la hCG en la gestación humana, la eCG probablemente fuera secretada por las células trofoblásticas de la placenta en desarrollo y luego llevada hacia el endometrio subyacente, acumulándose selectivamente en el mismo. (Catchpole y Lyons, 1934 citado por Allen y Stewart, 1993).

Los estudios cesaron por aproximadamente 9 años hasta que Cole descubrió la verdadera fuente de eCG. Unos 40 años antes, el anatomista alemán W. Schauder había mencionado la existencia de una serie de protuberancias endometriales con forma de platillo presentes en el cuerno uterino grávido de yeguas durante la primera mitad de la preñez. Estas estructuras, a las que Schauder no asignó ninguna función significativa en términos de placentación y mantenimiento de la preñez, presentaban una depresión central en donde existía un material pegajoso color miel. Fue el mismo Schauder quien denominó copas endometriales a estas estructuras (Schauder, 1912 citado por Allen y Stewart, 1993).

Cole y Goss estudiaron a las copas endometriales de Schauder y para su sorpresa encontraron que el tejido de la copa, e incluso la secreción exócrina asociada al mismo, contenía concentraciones de eCG mucho mayores que en el endometrio normal adyacente o en cualquier otra parte de la placenta fetal. Concluyeron, con bastante certeza, que las copas endometriales eran la fuente de eCG y que la hormona entraba a la circulación materna por vía de un complejo de largos sinusoides linfáticos existente en el estroma endometrial subyacente a cada copa (Cole y Goss, 1943 citado por Allen y Stewart, 1993). Por ende, parecía entonces que la eCG, a diferencia de la hCG en primates, era de origen materno.

Restaba aún cometer dos errores antes de aclarar la verdadera fuente de eCG. En un estudio, el grupo de la Universidad de Davis dio una detallada descripción morfológica del desarrollo y regresión de las copas endometriales (Clegg y col., 1954 citado por Allen y Stewart, 1993). Debido a que las copas endometriales no parecían tener directa conexión física con la placenta epiteliocorial subyacente, Clegg y col.

concluyeron erróneamente que las células de la copa, similares a las células de la decidua de humano y roedor, eran maternas en origen y se habían diferenciado de las células del estroma endometrial de una manera similar al desarrollo de la reacción decidual en el útero de roedor preñado o pseudopreñado en respuesta a la preñez o a un estímulo mecánico apropiado (Clegg y col., 1954; Kirby, 1968 citados por Allen y Stewart, 1993). Luego tiñeron secciones de copas endometriales con solución PAS (periodic acid - Schiff), considerada específica para moléculas proteicas (McManus, 1946 citado por Allen y Stewart, 1993), y el grupo de la Universidad de Davis concluyó incorrectamente que la eCG era secretada por el epitelio de las dilatadas glándulas endometriales presentes en la copa (Clegg y col., 1954 citado por Allen y Stewart, 1993).

Estos errores fueron subsanados en el transcurso de los siguientes 15 años, en primer lugar cuando Amoroso discutió los aspectos inmunológicos de las copas endometriales en varios estadios de la gestación (Amoroso, 1955 citado por Allen y Stewart, 1993) y luego por Allen cuando describió la relación entre el desarrollo de las copas endometriales al día 36 de la gestación y un engrosamiento del trofoblasto llamado faja coriónica (Allen, 1970 citado por Allen y Stewart, 1993). En este último estudio fue erróneamente concluido, en la base de evidencia histológica extraída de fijaciones de útero de yegua preñada, que la faja coriónica secretaba un "factor" humoral fetal, que pasaba hacia las glándulas en el área del endometrio adyacente e inducía a las células no diferenciadas del estroma vecino a las glándulas a experimentar una respuesta de decidualización y entonces transformarse en las células de las copas endometriales (Allen y Stewart, 1993).

Dos años después comenzó a conocerse con exactitud la fuente y mecanismo de producción de la eCG. Se disecó tejido de la faja coriónica de vesículas embrionarias equinas recuperadas intactas por histerectomía en los días 34 y 36 de gestación. El tejido fue desmenuzado finamente con tijera y cuando fueron cultivados in vitro como explantes simples produjeron colonias estables de grandes células epitelioides binucleadas que secretaban altas concentraciones de eCG hacia el medio de cultivo por más de 180 días. Las células de la faja cultivadas mostraron todas las características morfológicas de las células de las copas endometriales in vivo, y se transformaron similarmente cuando fueron transplantadas a sitios extrauterinos tales como el testículo (Allen y Moor, 1972 citado por Allen y Stewart, 1993). Subsecuentemente, un estudio de ultraestructura por microscopía de la interfase de la placenta de yeguas, entre los días 34 y 40 de gestación, demostró la migración de las células especializadas de la faja coriónica hacia el endometrio en los días 36 a 38, seguido por su rápida transformación en las grandes células secretoras de eCG de las copas endometriales, similares a las células deciduales (Allen y col., 1973 citado por Allen y Stewart, 1993). Por ende, las conclusiones originales de Catchpole y Lyons en 1934 fueron reivindicadas. Las células del trofoblasto fetal sí secretan eCG pero sólo aquellas pertenecientes a la faja coriónica cuando migran al endometrio en los días 36 a 38 para formar las copas endometriales (Allen y Stewart, 1993).

4.1.2 Desarrollo de la faja coriónica

El desarrollo del tejido progenitor de las copas endometriales, la faja coriónica, es un fenómeno poco comprendido. La faja fue descrita por primera vez por Ewart en 1897,



volviendo a ser mencionada por van Niekerk en 1965 y más detallada por van Niekerk y Allen en 1975 seguido al descubrimiento de su rol en la formación de las copas endometriales (Allen y Stewart, 1993).

La faja comprende un engrosamiento angosto y discreto del trofoblasto que se desarrolla alrededor de la circunferencia de la vesícula blastodérmica en el punto donde contactan el creciente alantoides con el saco vitelino en regresión. Entre los días 25 y 35 luego de la ovulación, se produce el desarrollo de la faja coriónica en la superficie externa del corion (Allen, 2001). En una investigación de cómo y por qué la faja coriónica invasora se desarrolla repentinamente, entre el día 25 y 35 de gestación, a partir de células trofoblásticas situadas adyacentes al alantocorion no invasor, Stewart y col. en 1995 observaron que la faja es más gruesa en el borde que linda con el alantoides y muestra un afinamiento en el borde adyacente al saco vitelino. Además, los pequeños vasos sanguíneos que provenían del vascularizado mesodermo alantoideo se extienden debajo de la no vascularizada faja coriónica, pero solamente hasta aproximadamente la mitad del ancho de la misma. Usaron técnicas de hibridación in situ para demostrar que el mesénquima alantoideo, en la preñez del caballo, es la fuente principal de un factor de crecimiento altamente mitogénico y motogénico, el factor de crecimiento hepatocítico – factor de expansión (HGF-SF), secretado durante la primera parte de la gestación. El HGF-SF fue descrito y parcialmente caracterizado por primera vez en 1984 como el factor de crecimiento hepatocítico (HGF), debido a su habilidad para estimular la proliferación de hepatocitos in vitro (Nakamura y col., 1984 citado por Stewart, 1996) y más adelante, como factor de expansión (SF) por su capacidad de promover la expansión de células epiteliales in vitro (Stoker y col., 1987 citado por Stewart, 1996). Siete años después, el HGF y el SF mostraron ser idénticos y de aquí en adelante fueron llamados en conjunto como HGF-SF (Weidner y col., 1991 citado por Stewart, 1996). El HGF-SF ha demostrado tener varias acciones adicionales en las células, incluyendo inducción de la morfogénesis, estimulación de la adherencia de células T al endotelio y el favorecer la supervivencia neuronal (Brinkmann y col., 1995; Zarnegar y Michalopoulos, 1995 citados por Stewart, 1996). Ha sido postulado que el mismo ejerce un rol fundamental en la regeneración tisular ante heridas y esto ha estimulado un gran interés en esta molécula y su modo de acción (Stewart, 1996). El receptor para el HGF-SF es el producto de un proto-oncogen, el c-met (Tsarfaty y col., 1994 citado por Stewart, 1996). En prácticamente todos los tejidos examinados, tanto durante el desarrollo como en el adulto, el HGF-SF es expresado por los tejidos mesenquimales y el c-met es expresado por el epitelio adyacente (Stewart, 1996). Por ejemplo, en el hígado, el HGF-SF es expresado por las células no parenquimatosas y el c-met por los hepatocitos (Hu y col., 1993 citado por Stewart, 1996).

Como se describió anteriormente, la placenta equina tiene la particularidad de que únicamente las células del trofoblasto restringidas a una discreta región anular de la placenta, la faja coriónica, se vuelven binucleadas e invaden el endometrio, mientras que las células trofoblásticas que no pertenecen a esta región no adquieren estas características (Allen y Moor, 1972 citado por Stewart, 1996). La faja coriónica se desarrolla a partir de la rápida multiplicación de las células del trofoblasto que cubren el punto de unión entre el alantoides en crecimiento y el saco vitelino en regresión (Stewart, 1996). En experimentos realizados por Stout y col. (2003) se demostró que el 90% de las células trofoblásticas de la faja coriónica en desarrollo estaban en activa

división, mientras que en el corion adyacente las células en activa división no alcanzan al 10 % (Stout y col., 2003). La explicación más probable para que la diferenciación trofoblástica se produzca en esta área localizada es, como se explicó anteriormente, un estímulo mitogénico, proveniente del mesénquima alantoideo, que actúa en el trofoblasto adyacente a la membrana corioalantoidea pero no en aquel que forma parte de la misma. Todo el trofoblasto en contacto con el mesénquima alantoideo responde al estímulo, pero solamente el área del trofoblasto que se convertirá en la faja coriónica, adquiere un fenotipo invasor, ya que el corion en esta región no está unido al alantoides y, por lo tanto, tiene un fenotipo y respuesta diferente (Stewart, 1996). Además, la hibridación in situ demostró que en el mesénquima alantoideo existe mRNA que codifica para HGF-SF y en el trofoblasto mRNA que codifica para c-met, con concentraciones particularmente altas en la faja coriónica (Stewart y col., 1995 citado por Stewart, 1996). Estos resultados indican un papel importante del HGF-SF en el desarrollo de la placenta equina y proporcionan una explicación factible del desarrollo de la faja coriónica (Stewart, 1996).

Debido a que el corion y el alantoides están fusionados por el tejido mesodermal que secreta el factor, y puesto que las células del trofoblasto se unen firmemente a la membrana basal, el crecimiento mitógeno-inducido ocurre como extensión simple del alantocorion. Sin embargo, en la faja coriónica, que se expone a un estímulo mitogénico del HGF-SF llevado por los vasos sanguíneos mesenquimales extendidos debajo de ella, las células hiperplásicas del trofoblasto pueden solamente apilarse una sobre otra, más que extenderse de una manera lineal (Stewart y col. 1995, citado por Allen 2001). Investigaciones previas llevaron a la postulación de que las células de la faja coriónica probablemente recibieran las mismas señales mitogénicas que el trofoblasto no invasor pero debido a que el mesénquima no está fusionado al corion en la región de la faja, las células trofoblásticas mitógeno-inducidas se apilan una con otra en lugar de expandirse como una simple capa (Stewart y col., 1995). Sin embargo, posteriores exámenes de las membranas en esta región indicaron que el mesénquima podría, en realidad, migrar por debajo de la región de la faja coriónica; esto se ha demostrado por inmunohistoquímica. La razón por la cual las células de la faja se apilan en lugar de expandirse podría ser, entonces, que la región que les da origen carece de endodermo. Esto sugiere que un corioalantoides formado de derivados de ectodermo, mesodermo y endodermo es siempre no invasor, mientras que un corioalantoides formado de ectodermo y mesodermo es siempre invasor (Stewart y col., 1999).

Así se forma la faja coriónica discreta y espesa (Stewart y col. 1995, citado por Allen 2001), que al comienzo es vista como una serie de ondulaciones poco elevadas en el corion, haciéndose más prominente en los siguientes diez días para transformarse en vellosidades digitiformes debido a la rápida hiperplasia que sufren las células trofoblásticas en el ápice de cada pliegue. Las estructuras resultantes comienzan a plegarse y a aplanarse a causa de los efectos compresivos del tono uterino y de la expansión de la vesícula embrionaria (Allen, 2000). De esta manera el trofoblasto adopta, observándose en un corte transversal, una forma estratificada de unas 8 a 10 células de espesor que contiene estructuras similares a glándulas, compuestas por la superficie epitelial de los pliegues adyacentes. Estas glándulas simples secretan una sustancia mucoide que ayuda a la unión de la superficie externa de la faja a la superficie luminal del endometrio (Allen y Stewart, 1993). Alrededor del día 36 - 38 de

gestación, con alguna variación temporal individual, la faja se desprende enteramente del corion y las ahora células binucleadas de la misma comienzan a invadir el tejido materno (Allen, 2000), mediante un mecanismo de pseudópodos romos que fuerzan su camino entre, y algunas veces a través, de las células epiteliales de la superficie luminal, las que ocasionalmente son fagocitadas durante el proceso destructivo. La integridad del corion subyacente a la faja coriónica, es mantenida por una sola capa de células trofoblásticas, aparentemente no diferenciadas, que confluyen con el resto del corion (Allen y Stewart, 1993). Una vez que las células de la faja alcanzan las glándulas endometriales, migran por debajo de las mismas, atravesando eventualmente la membrana basal e invadiendo el estroma uterino. Luego, todas las células invasoras repentinamente se vuelven redondeadas y aumentan su tamaño de tal manera que se convierten en una masa firmemente empaquetada, lo que da lugar a protuberancias llamadas copas endometriales, secretoras de eCG (Allen, 2000), hormona que es liberada a la circulación materna por vía del sistema linfático que drena al útero (Allen y Stewart, 1993).

4.1.3 Estructura y desarrollo de las copas endometriales

Las copas endometriales pueden ser observadas a simple vista alrededor del día 40 post ovulación como una serie de placas pálidas levemente elevadas de la superficie endometrial. Se distribuyen en forma de herradura o círculo en el cuerno uterino grávido, imitando a la faja coriónica que le dio origen. El tamaño y forma de las copas varía enormemente desde círculos que pueden alcanzar 1 cm. de diámetro hasta cintas de tejido de al menos 10 cm. e incluso 30 cm. de longitud (Allen, 2000). Esto depende de la combinación del desarrollo general y ancho de la faja coriónica progenitora y de la configuración del endometrio invadido (Allen, 2001), de manera que las formas más largas se encuentran en lugares donde el endometrio que se corresponde con la faja es aplanado, mientras que las formas aisladas se ubican en el ápice de los pliegues en regiones más onduladas, que luego se aplanarán a medida que el útero se expande con el avance de la gestación (Allen, 2000).

Las copas crecen constantemente para alcanzar su máximo tamaño y capacidad de secreción hormonal entre el día 60 y 70 de gestación. En este momento, se elevan de la superficie del endometrio y adquieren un aspecto de platillo o úlcera debido al crecimiento excesivo de los bordes y a la degeneración celular y muda que tiene lugar en la región central. Histológicamente, cada copa consiste ahora en una masa de células entramada por vasos sanguíneos y porciones fúndicas dilatadas de las glándulas endometriales, cuyas porciones apicales fueron obliteradas durante la invasión de la faja alrededor del día 36. Estas células poseen varias características únicas: son grandes comparadas con otras células del útero; su núcleo es grande, eucromático y contiene nucleolos densos característicos; el citoplasma está lleno de perfiles cortos de retículo endoplásmico, algunas gotas lipídicas y pocas mitocondrias; el aparato de Golgi es una estructura significativa. Las células no contienen gránulos secretorios densos evidentes, la secreción, por lo tanto, es del tipo constitutiva (liberándose a medida que es producida) más que regulada (sólo tiene lugar cuando hay una señal específica) como en el caso de la gonadotropina pituitaria (Allen y Stewart, 1993).

Un importante aspecto de las copas endometriales es la pronunciada respuesta inmune materna, humoral y mediada por células, inducida por antígenos extraños expresados por las células fetales que formarán la copa (Allen, 2004). Las células invasoras de la faja coriónica, pero no el trofoblasto ni el invasor del alantocorion, expresan en su superficie altas concentraciones de antígenos paternalmente heredados- complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC)- antes y hasta algunos días después de invadir el endometrio materno para formar las copas endometriales (Crump y col., 1987; Donaldson y col., 1990 citados por Allen, 2001). Los antígenos clase I del MHC estimulan una fuerte respuesta humoral materna en todas las yeguas que lleven fetos diferentes en la barrera clase I del MHC, desarrollando altos títulos de anticuerpos linfocitotóxicos específicos en el plazo de 10 -14 días después del desarrollo inicial de las copas endometriales (Antczak y col., 1982; Kydd y col., 1982 citados por Allen, 2001). Estos anticuerpos no son encontrados en caballos machos o yeguas vírgenes, como tampoco han sido identificados en hembras preñadas de otras especies (Willis y Thomas, 2005). Los anticuerpos persisten durante el transcurso de la preñez y su concentración en suero aumenta cada vez más temprano si la yegua es servida con el mismo semental en los años sucesivos (Antczak y col., 1984 citado por Allen, 2001), y en yeguas a las cuales se les implanta piel del semental antes del servicio (D.F. Antczak, comunicación personal, Allen, 2001). Además, la acumulación de leucocitos maternos sobre las copas y su papel en la destrucción de las células de la misma después del día 70 (Allen, 1975 citado por Allen, 2001) indica una fuerte reacción materna mediada por células contra las células invasoras del trofoblasto. Grandes sinusoides linfáticos se dirigen hacia el estroma subyacente a cada copa y un número en constante aumento de leucocitos maternos, consistente en linfocitos CD4+ y CD8+, células plasmáticas, macrófagos y eosinófilos, comienza a acumularse en el estroma de la periferia (Kydd y col., 1991; Grünig y col., 1995 citados por Allen, 2001).

Más allá del día 70 de gestación, las copas endometriales comienzan a tornarse pálidas debido a la degeneración y muerte de las células, principalmente en su depresión central. La eliminación del tejido necrótico superficial reestablece la liberación de la secreción de las glándulas endometriales distendidas, que descargan su acúmulo en la superficie de la copa, mezclándose con las células necróticas para formar un coágulo denso, color miel y muy rico en eCG (pudiendo contener hasta 1.000.000 de UI de eCG / gramo de tejido fresco (Clegg y col., 1954; Rowlands, 1962 citados por Allen, 1975)) que se adhiere a la superficie del alantocorion adyacente. Coincidentemente los leucocitos acumulados en la periferia de la copa, comienzan a invadirla activamente y destruyen el tejido fetal extraño. En la mayoría de los casos, pero sujeto a una considerable variación entre yeguas (Allen, 2000) y entre copas endometriales en una misma yegua (Allen y Stewart, 1993), alrededor del día 100 -120 de gestación, las células necróticas mezcladas con la secreción exócrina, son arrancadas de la superficie del endometrio (Allen, 2000). Estas quedan libres en el lumen uterino y eventualmente se indentan en el alantocorion para formar un saco pendular conocido como bolsita alantocoriónica (Clegg y col., 1954 citado por Allen, 2001).

Aunque está claro que los antígenos paternos clase I del MHC expresados por las células invasoras de la faja coriónica (Donaldson y col., 1990 citado por Allen, 2001) son el estímulo para la respuesta humoral de la madre hacia el feto en la gestación, la

naturaleza y fuente de los antígenos que estimulan esta reacción mediada por células no están claros (Allen y col, 1999; Allen, 2001). Las copas viven y secretan cantidades equivalentes de eCG tanto en las yeguas que llevan fetos MHC-incompatibles como MHC-compatibles (Allen y col., 1983 citado por Allen, 2001), y la respuesta leucocítica montada contra las copas es más intensa y destructiva en las yeguas que llevan fetos híbridos interespecie (mula) que en las yeguas que llevan fetos intraespecie (Allen, 1975 citado por Allen, 2001). Así, probablemente, los antígenos trofoblásticos tejido-específicos y los antígenos no-MHC especie-específicos están detrás de la observada respuesta materna mediada por células hacia las copas endometriales (Allen, 1982; Antczak y Allen, 1984 citados por Allen, 2001).

4.1.4 Funciones y características fisicoquímicas de la eCG

Las copas endometriales contribuyen al mantenimiento de la gestación en la yegua. Las células de la copa secretan cantidades apreciables de la hormona gonadotrofina coriónica equina (eCG), glicoproteína ácida de alto peso molecular (70.000 kDa) (Gospodorowicz, 1972 citado por Allen y col, 2002) con un anormalmente alto contenido de carbohidratos (45%) consistiendo principalmente de ácido siálico, galactosa y glucosamina. Posee un bajo punto isoeléctrico de tan solo 2,4 y es marcadamente resistente a la hidrólisis ácida (Rimington y Rowlands, 1944; Raacke y col., 1957 citados por Allen y Stewart, 1993). Como en las gonadotropinas, coriónica y pituitaria, y la hormona estimulante de la tiroides (TSH), la eCG es una glicoproteína heterodimérica que consiste en subunidades α y β unidas no covalentemente (Papkoff, 1974 citado por Allen y Stewart, 1993). Las subunidades α son idénticas en todas las especies, mientras que las subunidades β difieren, indicando que la especificidad de acción debe residir en esta última (Allen y Stewart, 1993). Esta hormona, conocida anteriormente como gonadotrofina del suero de yegua preñada (PMSG), expresa tanto actividad FSH como LH, en una relación de 1,4:1 (Allen, 2000). La propiedad FSH de la eCG se ha utilizado a gran escala como el método más económico y accesible para estimular el crecimiento folicular y ovulación en animales de laboratorio y de granja. En programas de sincronización de celo es utilizada a bajas dosis como complemento al momento de retirar progestágenos y en otros programas para inducir niveles normales de ovulación en animales prepúberes y adultos. Alternativamente, cuando es administrada a altas dosis, su componente FSH estimula el desarrollo de múltiples folículos, que luego ovularán por acción del componente LH para dar lugar a la superovulación requerida para programas de transferencia de embriones (Rowson, 1979; Saumande y Chupin, 1977 citados por Allen y Stewart, 1993). Sin embargo, en esta última aplicación, la excepcionalmente larga vida media de la molécula de eCG puede ser una desventaja, ya que una sola inyección de la hormona puede estimular dos o más ondas ováricas de crecimiento folicular asincrónico. Adicionalmente, el componente LH de la eCG puede hacer ovular un folículo parcialmente maduro en los ovarios del receptor al momento de la inyección, y la progesterona secretada por el cuerpo lúteo resultante puede interferir con la ovulación de la subsecuente onda folicular estimulada por el componente FSH de la eCG (Christie y col., 1979 citado por Allen y Stewart, 1993).

Poco después del descubrimiento de la eCG en 1930, Cole y sus colegas dirigieron su atención a la estrecha relación existente entre la secreción de la hormona

gonadotrófica y el grado considerable de desarrollo luteal secundario que tiene lugar en los ovarios de la yegua (Cole y col., 1931 citado por Allen y Stewart, 1993). Ellos notaron que poco después de la aparición de la eCG en la sangre materna, alrededor del día 40, una o más ovulaciones accesorias ocurrían en los ovarios maternos, con posteriores estructuras luteales secundarias, apareciendo de una manera acumulativa en los siguientes 100 o más días de gestación. Amoroso y col. describieron el mismo fenómeno (Amoroso y col., 1948 citado por Allen y Stewart, 1993), y Allen contó hasta 35 diferentes estructuras luteales en los ovarios de la yegua al día 140 de preñez (Allen, 1970 citado por Allen y Stewart, 1993). Este coincidente desarrollo, persistencia y regresión de las copas endometriales y cuerpos lúteos secundarios en yeguas entre 40 y 150 días de gestación, junto con las conocidas actividades biológicas de la eCG, llevaron a asumir en general, que la eCG proveía ambos estímulos (luteotrófico y gonadotrófico) para estas estructuras luteales accesorias; sin embargo, varios estudios más recientes han revelado el verdadero fenómeno (Allen y Stewart, 1993).

Mediciones seriadas de las concentraciones de FSH y LH en el suero de yeguas, durante el ciclo estral y la preñez, demostraron que a través de los meses de primavera-verano de la temporada reproductiva, la FSH era liberada por la glándula pituitaria a intervalos de aproximadamente 10 - 12 días (Evans e Irvine, 1975; Urwin y Allen, 1982 citados por Allen y Stewart, 1993). Este patrón rítmico de liberación es controlado por la cantidad de horas luz y la secreción folicular de inhibina y/o estradiol, pero no es influenciada por el efecto feedback negativo de la progesterona. Por ende, la liberación de FSH pituitaria se mantiene sin cambios durante la preñez temprana al igual que en el ciclo estral (Allen y Stewart, 1993). Estos descubrimientos coinciden con las anteriores observaciones de Bain, van Rensburg y van Niekerk, quienes describieron considerables crecimientos foliculares en los ovarios de la yegua alrededor del día 18-23 de gestación y, por ende, el momento en que la yegua presumiblemente hubiera retornado al estro y re-ovulado de no haber estado preñada (Bain, 1967; van Rensburg y van Niekerk, 1968 citados por Allen y Stewart, 1993). Sin embargo, estos grandes folículos no ovulan, y tienden a regresar dejando paso a próximas ondas de crecimiento folicular unos 10-12 días después. Normalmente, esto coincide con el inicio de la secreción de eCG entre los días 36 - 40 cuando ocurren dos cambios significativos en la producción ovárica de hormona esteroide (Allen y Stewart, 1993). En primer lugar, como fue demostrado originalmente por Terqui y Palmer y confirmado por Jeffcott y col., existe un agudo y pronunciado aumento en las concentraciones de estrógeno en plasma; como fue demostrado por estudios de ovariectomía, este aumento en la producción es ovárico en origen (Terqui y Palmer, 1979; Jeffcott y col., 1987 citados por Allen y Stewart, 1993). En segundo lugar, en la mayoría, pero no en todas las yeguas, un pronunciado aumento en las concentraciones plasmáticas de progesterona es observado como resultado de la primera ovulación secundaria (Allen, 1979 citado por Allen y Stewart, 1993).

Durante los siguientes 80 -100 días de gestación se producen apreciables elevaciones adicionales en la concentración de progesterona en plasma, cada una señalando el desarrollo de una nueva estructura luteal secundaria, formada tanto por ovulación como por luteinización sin ruptura de un folículo maduro. Claramente, es la continua secreción de FSH pituitaria, y no la eCG, quien estimula las ondas de crecimiento folicular en la yegua preñada. El componente LH de la eCG, en la ausencia de LH pituitaria, simplemente actúa para inducir la maduración final del folículo dominante,

produciendo su ovulación o luteinización. Tal concepto es apoyado por el descubrimiento de que las yeguas que conciben tarde en la temporada reproductiva, de forma tal que la preñez temprana transcurre durante el invierno (período de inactividad ovárica), muestran concentraciones normales de eCG pero poseen varias ovulaciones secundarias menos que en las yeguas que conciben al principio de la temporada (Allen, 1979 citado por Allen y Stewart, 1993).

Ha sido demostrado, a través de cortes de tejido luteal mantenidos in vitro, que la eCG estimula la secreción de progesterona y la hormona, por lo tanto, debe ser considerada como poseedora de propiedades luteotróficas (Squires y col., 1979 citado por Allen y Stewart, 1993). Sin embargo, esta función parece tener bajos niveles in vivo, lo que podría ser importante para prevenir la hiperestimulación de los ovarios de la yegua cada vez que ésta se preña. La gonadotropina coriónica equina exhibe una capacidad mucho menor para unirse a los receptores gonadales equinos (<2%) que la FSH y LH pituitaria equina o humana, aunque se une con la misma avidéz que estas últimas, y otras gonadotropinas pituitarias, a los tejidos gonadales de otras especies (Stewart y Allen, 1979 citado por Allen y Stewart, 1993). Por lo tanto, en lugar de existir una gran estimulación alrededor del día 60 de preñez, cuando los niveles de eCG son máximos, solo se desarrollan las simples ovulaciones descritas anteriormente como consecuencia de las ondas de crecimiento folicular estimuladas por la FSH pituitaria (Allen y Stewart, 1993).

4.1.5 Dinámica de la eCG y factores que influyen en su producción

Las concentraciones de eCG en el suero de la yegua preñada aumentan rápidamente a partir del día 40, llegando a valores máximos variables (20 - 300 UI/mL.) entre los días 60 a 70 de gestación, luego declinan en paralelo a la degeneración de las copas endometriales (Vivo Rodríguez, 1997; Allen, 2000).

En experimentos realizados con yeguas de distintas razas, las diferencias individuales entre yeguas para la eCG fueron muy marcadas, tanto en el pico alcanzado, como en la duración de la actividad de la hormona en sangre. Como fue resaltado en trabajos previos (Allen, 1969 citado por Allen y col., 2002) los perfiles de la hormona tienden a aumentar y caer más bruscamente, alcanzar picos más altos y mostrar mayores variaciones individuales en yeguas de menor tamaño ("pony") en comparación con yeguas más grandes ("Thoroughbreds"), sin importar el tipo de feto que porten. Claramente, la cantidad de eCG producida es dependiente de la raza de la yegua, más que de la raza del feto (Allen y col., 2002). La cantidad de eCG producida por una yegua individual depende del volumen total de tejido endometrial que se desarrolla en útero (Allen, 1975) y esto a la vez es controlado por el espesor y desarrollo general de la faja coriónica del progenitor y cuánto de éste tejido se las "ingenia" para invadir el endometrio materno al día 36 para formar las copas endometriales (Allen y Stewart, 1992; Enders y col., 1996 citados por Allen y col., 2002).

El número de partos y la edad de la yegua (Day y Rowlands, 1947 citados por Allen y col., 2002) el genotipo fetal (Bielanski y col., 1975; Allen, 1969 citados por Allen y col., 2002) y el ambiente uterino (Allen y col., 1993 citados por Allen y col., 2002) han sido implicados en ejercer marcados efectos en el desarrollo y producción de las copas endometriales y en el estudio realizado por Allen (2002), probablemente una interacción entre el genotipo (raza) del feto y el grado de dobleces y rugosidades en el

endometrio de la madre, genética o portadora, podrían haber ejercido la mayor influencia en la cantidad de copa endometrial que iría a desarrollarse y secretar la hormona en la circulación materna (Allen y Stewart, 1992; Allen y col., 2002).

Varios aspectos influyen en la producción de eCG in vivo (Rowlands, 1963 citado por Allen, 1975), el más profundo de todos es el genotipo fetal (Bielanski y col., 1956; Clegg y col., 1962; Allen, 1969 citados por Allen, 1975).

Otro aspecto que refleja la marcada influencia del genotipo fetal en la reacción de las copas endometriales se refleja en la reacción inmunológica desarrollada. En yeguas que portan fetos de mula, el proceso de acumulación linfocítica e invasión fue enormemente acelerado y realzado en comparación con las yeguas que llevaban gestaciones intraespecie.

El crecimiento de la faja coriónica generado por el factor HGF-SF también podría explicar las interactuantes influencias del genotipo fetal y ambiente uterino en el tamaño de la faja y la capacidad de secreción hormonal de las resultantes copas endometriales. La faja que se desarrolla en la vesícula blastodérmica del burro (*E. asinus* X *E. asinus*) y el híbrido mula (*E. asinus* ♂ X *E. caballus* ♀), ambas con un burro como padre, es menos desarrollada al momento de la invasión al endometrio materno que sus contrapartes, la vesícula embrionaria de caballo (*E. caballus* X *E. caballus*) y la de burdégano (*E. caballus* ♂ X *E. asinus* ♀), ambas con un caballo como padre. Inicialmente se creyó que esta diferencia podría ser causada por una impronta genética materna asociada, al menos, con el desarrollo de la porción de la faja coriónica de la placenta. Sin embargo el rol dominante del ambiente uterino en este proceso fue dramáticamente demostrado cuando una media mórula de mula biseccionada fue colocada en el útero de una yegua y la otra mitad en el útero de una burra (Allen y col., 1993 citado por Allen y Stewart, 2001). En la yegua se desarrolló una típica faja coriónica angosta, que dio lugar a copas endometriales pequeñas y baja concentración de eCG, pero en la burra se desarrolló una faja coriónica mucho más grande, ancha y productiva, como típicamente desarrolla en el burdégano con el caballo como semental. Por ende, el ambiente uterino fue capaz de invalidar cualquier influencia genética (Allen y col., 1993 citado por Allen y Stewart, 2001).

4.1.6 Rol de la eCG en la yegua

Durante el período de secreción de la hormona, el componente LH de la eCG induce luteinización con o sin ovulación del folículo dominante de las ondas foliculares ováricas, cuyo desarrollo es estimulado, durante la primera mitad de la gestación, por la FSH pituitaria que sin interrupciones desde el último ciclo estral, alcanza picos a intervalos de 10 -12 días (Vivo Rodríguez, 1997; Allen, 2000). Así, cuerpos lúteos secundarios comienzan a acumularse en los ovarios maternos a partir del momento de la primera aparición de eCG en la sangre de la yegua, con el consecuente aumento en la concentración de progesterona. Los cuerpos lúteos persisten aproximadamente hasta la mitad de la gestación, momento en el cual pasa a ser la placenta la única fuente de progesterona para llevar la gestación a término. Además de estimular el aumento en la producción de progesterona, la eCG también induce un claro incremento en las concentraciones de estrógeno conjugado en la sangre periférica a partir de los días 38 - 40. Estos estrógenos son de origen ovárico y secretados en mayor medida por el tejido luteal que por el folicular. Después del día 40 las

concentraciones de estrógeno en suero forman una meseta hasta los días 70 - 80, cuando comienza un segundo y prolongado aumento de origen fetoplacentario (Allen, 2001).

El cuestionamiento acerca de la necesidad de cualquier rol luteotrófico de la eCG en la preñez equina surgió de recientes investigaciones respecto a preñeces equinas extra-especie creadas por transferencia de embriones. En yeguas (2n=64) que portan embriones de burro (2n=62) transferidos, la faja coriónica del burro falla en invadir al endometrio equino durante los días 36-38, con el resultante no desarrollo de las copas endometriales y completa ausencia de eCG en la sangre materna (Allen, 1982 citado por Allen y Stewart, 1993). Aunque la mayoría de estas preñeces burro en caballo son abortadas al día 80-90 de gestación, aproximadamente, en un 30% de ellas, se produce la normal implantación y la gestación es llevada a término en completa ausencia de eCG y sin el desarrollo de ningún cuerpo lúteo secundario más allá del día 40; el cuerpo lúteo primario continúa secretando bajas, pero adecuadas cantidades de progesterona para mantener la preñez hasta que la placenta está suficientemente desarrollada para asumir este rol, alrededor de los días 90-100 (Allen y col., 1990 citado por Allen y Stewart, 1993).

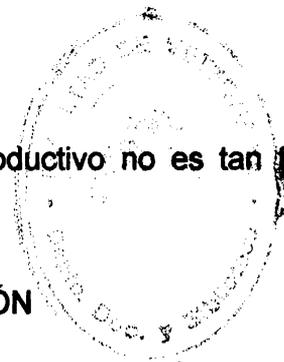
La característica más llamativa del fracasado modelo de gestación burro en caballo es la carencia de la normal interdigitación entre el alantocorion y el endometrio, en el cual las copas no se desarrollan y la respuesta materna humoral y mediada por células están ausentes. Esta falta de interdigitación eleva la posibilidad de que la reacción de las copas endometriales ejerza alguna influencia, tal vez un estímulo, para iniciar la conexión microvellosa estable entre las capas epiteliales fetales y maternas en el útero, piedra angular en el proceso de placentación en este género (Allen, 2001).

Según Wooding y col. las células de la faja coriónica comienzan a secretar eCG en el día 32 de gestación, tres días antes de invadir el endometrio (Wooding y col, 2001 citado por Flood, 2003). Es por ello que se plantea la posibilidad de que la eCG cumpla un rol en la invasión del trofoblasto, como sucede con la hCG en humanos (Nakayama y col., 2003 citado por Flood, 2003).

4. 2 DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN MEDIANTE PALPACIÓN RECTAL

Con la debida precaución y experiencia, la palpación de la vesícula embrionaria es posible alrededor del día 20. La ubicación de la misma en el útero es ventral y por lo común está localizada en la zona de transición entre el cuerpo y uno de los cuernos. La técnica para la localización consiste en palpar el aspecto ventral del útero con los dedos doblados hacia el margen craneal del mismo y alcanzar por debajo el cuerpo y cuerno. La vesícula embrionaria en el día 20 mide aproximadamente 30 a 40 mm de diámetro. Una delicada palpación revelará una pequeña disminución en el tono de la pared uterina encima del área vesicular si se compara con el resto del cuerno uterino. El feto/embrión no puede ser palpado en este estadio por ser extremadamente pequeño (1-2 mm). Una preñez temprana podría ser confundida con un gran quiste

uterino; sin embargo, en este caso, el tono del tracto reproductivo no es tan firme como en la preñez (McKinnon, 1993).



4.3 MEDICIÓN DE eCG COMO DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN

Los métodos inmunológicos de diagnóstico de preñez generalmente se basan en la reacción antígeno-anticuerpo. El anticuerpo es producido por hiperinmunización de otro animal, como por ejemplo el conejo, utilizando la eCG como antígeno. Uno de los métodos, el ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), requiere un anticuerpo específico para eCG que se adhiere a una fase sólida (microplátalo); si la eCG está presente en el suero de la yegua ésta sirve como un antígeno y se une al plátalo que contiene el anticuerpo. Una reacción enzimática y un cambio de color son usados para cuantificar la eCG. Al haber sido comparado el test de ELISA con otros métodos inmunológicos de detección de eCG, se concluyó que éste era capaz de detectar más tempranamente (día 35) la presencia de la hormona (McKinnon, 1993).

4.4 DINÁMICA DE LA eCG LUEGO DE LA PÉRDIDA DE LA GESTACIÓN

Un aspecto no deseable de las copas endometriales, es su inalterada capacidad de producir eCG luego de la pérdida de la preñez (Ginther, 1998). El período durante el cual la PMSG se mantuvo detectable en sangre luego del aborto fue determinado para confirmar los hallazgos de Mitchell, (1971). El tiempo medio de 134 días post-concepción fue similar a los 129 días post-concepción resultado del grupo de yeguas de edad similar cuyas preñeces no terminaron prematuramente. La laparotomía realizada a la yeguas que abortaron demostró que la presencia de PMSG en la sangre podría estar relacionada a las copas endometriales persistentes (Mitchell y Betteridge, 1972 citado por Mitchell y Allen, 1975). No hubo evidencia de que las pérdidas de preñez estuvieran relacionadas con niveles de PMSG, porque los últimos fueron similares en yeguas que abortaron y en yeguas con preñeces normales (Allen, 1969 citado por Mitchell y Allen, 1975).

Cuando el aborto ocurre luego del día 35, las copas endometriales pueden persistir por un corto tiempo, lo que significa que a) la eCG es todavía detectable y puede ser responsable de falsos positivos en el diagnóstico de preñez y b) éstas yeguas comúnmente fallan en retornar al estro (McKinnon, 1993).

En estudios realizados por Douglas y col. se observó que yeguas en las que se indujo el aborto con PG F2 α entre los días 80-90 de gestación mostraron celo a los dos días del aborto con ovulación 4,5 días después (Douglas y col., 1974). Jeffcott y col. reportaron que la pérdida fetal, luego de la formación de las copas endometriales, no pareció afectar la subsecuente secreción de eCG (Jeffcott y col., 1987). Sin embargo, Fey y Douglas observaron que las concentraciones en plasma de eCG en los días 42 - 45 de gestación fueron menores en yeguas que abortaron (3,3 UI/mL) que en aquellas yeguas que mantuvieron normalmente la gestación (19,6 UI/mL) (Fey y Douglas citado por Jeffcott y col., 1987).

Darenius también encontró que la producción de eCG disminuyó levemente cuando el feto murió pocos días después de la formación de las copas endometriales. Debido a que la presencia de esta hormona está asociada con una gran variación individual, con yeguas produciendo mínimas cantidades de eCG y aún así llevando el feto a término, es difícil determinar un mínimo nivel necesario para el desarrollo normal de la preñez (Darenius, 1987).

En lo que refiere a la presentación del estro, cuando las copas endometriales son funcionales, generalmente el aborto no es seguido de presentación de estro. De hecho, en algunos estudios, el estro y la ovulación fueron demorados hasta el día 100–120, cuando las copas endometriales regresaron. Ocasionalmente, sin embargo, el estro con ovulación puede observarse 2-3 días post aborto, aunque la fertilidad del mismo no ha sido bien documentada. Eventualmente pueden ocurrir estros anovulatorios con un sustancial desarrollo folicular antes del cese de la función de las copas endometriales (Lofstedt, 1986).

La terapia con prostaglandinas parece no tener efecto en la función de las copas endometriales, y las yeguas se mantiene positivas a tests para la hormona incluso luego de ocurrido el aborto. Una idéntica situación se da luego de ocurrido el aborto espontáneo (Lofstedt, 1986).

En un estudio realizado por Squires y col. un grupo de yeguas con 70 días de gestación fue tratado con un análogo de prostaglandina (fluprostenol) con el fin de inducir el aborto. Aparentemente, la función de las copas endometriales no fue alterada luego de la inyección de fluprostenol ya que las concentraciones de eCG se mantuvieron elevadas durante, al menos, una semana luego de la inyección. El estro acompañado por ovulación se demoró aproximadamente 40-50 días (Squires y col., 1980).

Si un feto muere entre 40 y 140 días de gestación, las copas endometriales (tejido fetal independiente de la supervivencia fetal) continúan secretando eCG que sigue estimulando el desarrollo de cuerpos lúteos anovulatorios en los ovarios de la yegua, evitando que ésta retorne a ciclar normalmente y vuelva a preñarse durante la misma temporada (Volkman, 2002).

Si la preñez falla, cualquiera sea la razón, luego del día 40, cuando la invasión del endometrio por las células de la faja coriónica ya ha tenido lugar, las copas endometriales resultantes persistirán y continuarán secretando eCG durante un período de 3-5 meses, tal como sucede en la preñez normal (Allen, 1975; Daels y col., 1991 citados por Allen, 2003).

La concentración de eCG presente en la sangre de la yegua luego de la pérdida de la preñez, refleja directamente la cantidad total de tejido activo perteneciente a las copas endometriales, dependiente a la vez del desarrollo de la faja coriónica del progenitor e influenciado en gran medida por el genotipo fetal y el ambiente uterino (Allen y col., 1993 citado por Allen, 2003). Por ende, las yeguas que desarrollan copas endometriales pequeñas y, por tanto, exhiben niveles relativamente bajos de eCG (por ejemplo: < 30 UI/ml.) entre los días 40 y 80 post cubrición, frecuentemente responderán a la inducción de la luteólisis, controlada por medición de progesterona, y presentarán un estro ovulatorio verdadero. El servicio puede resultar en concepción y establecimiento de una segunda preñez; el desarrollo embrionario temprano y la placentación no son interferidos por las persistentes copas endometriales y los continuos bajos niveles de eCG en la sangre de la yegua (Allen, observaciones no

publicadas citadas por Allen, 2003). La experiencia relata que, en yeguas con una gran cantidad de tejido perteneciente a las copas endometriales y altas concentraciones de eCG (> 80 UI/ml.) luego de la pérdida de la preñez, y especialmente aquellas que tuvieron mellizos y por lo tanto dos sets de copas endometriales secretando el doble de eCG (Allen, 1970 citado por Allen, 2003), los ovarios se vuelven pequeños, duros y completamente inactivos a medida que la yegua ingresa en un profundo estado de anestro. Esto sería revertido, únicamente, a través de la degeneración de las copas y la resultante caída de las concentraciones de eCG en el suero. Por lo tanto, el único tratamiento viable en estos animales es la ablación láser guiada por video-endoscopia de las copas endometriales (Bracher y col., 1994 citado por Allen, 2003).

En resumen, la medición de la concentración de eCG y progestágenos, mediante el método de ELISA, es el método de laboratorio más útil para encarar una pérdida de preñez después del día 40. Un buen análogo de prostaglandina F₂α, administrado diariamente o a días alternos mientras se monitorea la progesterona, y las facilidades de la técnica láser mencionada anteriormente son la mejor opción en tratamientos para hacer que las yeguas afectadas retornen al estro y vuelvan a cubrirse tan pronto como sea posible luego del diagnóstico de la pérdida de preñez (Allen, 2003).

4.4.1 Persistencia de copas endometriales

La persistencia de copas endometriales es una condición patológica observada en yeguas que abortaron cuya causa determinante no es conocida. En esta circunstancia continúan produciendo eCG hasta aproximadamente 130 días luego de la concepción, cuando regresan. (Mitchell y Allen, 1975; Mitchell, 1971 citado por Silva y col. 1995).

Típicamente, las copas endometriales no son fácilmente identificables mediante ultrasonografía, pero son más fáciles de ver durante el proceso de calcificación distrófica. Las áreas hiperecóticas son copas endometriales retenidas que se acompañan de ovarios con folículos luteinizados anovulatorios. El examen histológico confirmará la mineralización de las copas endometriales, fenómeno acompañado por altas concentraciones de eCG y progesterona en sangre (Willis y Riddle, 2005).

La persistencia de las copas endometriales es un inconveniente en el cual estas estructuras permanecen por semanas, o incluso meses, luego de un aborto, espontáneo o inducido, proveniente de una preñez que se desarrolló normalmente. Como es sabido, las copas endometriales se desarrollan en el endometrio materno, sin mantener más conexión física con las membranas fetales de donde se originaron una vez que invaden el tejido materno. Por ende la pérdida de la preñez no afecta las copas significativamente y las mismas pasan a través de su normal ciclo de crecimiento, secreción hormonal y degeneración tal como si la yegua continuara preñada. Curiosamente la eCG secretada por las persistentes copas endometriales tiende a suprimir, más que a estimular, la función ovárica materna y las yeguas más afectadas pasan a un tipo de anestro gonadotrofina- inducido del cual solo puede emerger y comenzar a producir nuevos folículos ovulatorios cuando las copas han finalmente regresado (en el tiempo equivalente a 100-140 días de gestación) y la eCG ha desaparecido de la sangre materna (Allen, 1975; Urwin y Allen, 1982 citado por Allen, 1994).

Sin embargo, la ablación de las copas endometriales persistentes por excisión quirúrgica (Urwin y Allen, 1982) o electrocauterio (Huber y col., 1993) vía laparotomía

por línea media realmente acelera el retorno de la yegua al estro y la normal función ovárica (Allen, 1994). Un ejemplo de lo primero es un trabajo realizado por Huber y col. (1993) en donde un grupo de yeguas fue sometido a una histerotomía con remoción del feto y anexos y extirpación quirúrgica del tejido de las copas endometriales. Esta última maniobra resultó en una caída abrupta de las concentraciones de eCG. El término tiempo medio fue utilizado para definir cuanto tiempo demora la eCG en reducir su concentración a la mitad; en el caso de las yeguas operadas los tiempos medios fueron de 5,4 a 8,8 días, valores significativamente menores a los de las yeguas controles del experimento (Huber y col., 1993).

4.5 INTERRUPCIÓN DE GESTACIÓN POR MANIOBRA MANUAL

Luego del día 80, la preñez puede ser terminada por la penetración manual del tapón cervical y la cuidadosa dilatación del cérvix por un período de 10 a 20 minutos. Si el alantocorion es simplemente desgarrado sin extraer el feto, el aborto usualmente ocurre entre 2 y 7 días. Sin embargo, la fiabilidad de este último método es pobremente documentada (Lofstedt, 1986). Sin embargo en nuestro país, Carbo y col. (1987), realizaron un trabajo en donde lograron interrumpir la gestación mediante la ruptura manual de la bolsa corioalantoidea, con un 100% de efectividad.

4.6 INTERRUPCIÓN DE GESTACIÓN POR ADMINISTRACIÓN DE PROSTAGLANDINA O ANÁLOGOS

Durante el período de secreción de eCG, la terminación de la preñez puede ser lograda a través de la administración de PG F₂α o análogos (Varner y col., 1988; Kasman y col., 1988 citados por Montavon y col., 1991), aunque luego del establecimiento de las copas endometriales, la respuesta a una sola inyección intramuscular de PG es variable, ya que esta es menos efectiva en causar el aborto en yeguas (Ginther 1979 citado por Jefcott y col., 1987). Existen varios trabajos que ratifican lo anterior.

En el estudio realizado por Douglas, una inyección intramuscular de 1,25 o 1,5 mg de PG administrada a yeguas con gestaciones entre 40 y 150 días resultó en aborto en, aproximadamente, la mitad de ellas (Douglas y col., 1974). En contraste, Squires observó que no abortó ninguna de las yeguas tratadas con una doble inyección intramuscular de fluprostenol a los días 70 y 77 de gestación (Squires, 1980). Múltiples inyecciones de PG, sin embargo, fueron eficaces. Todas las yeguas tratadas con 2,5-5,0 mg. de PG o 250 ug. de fluprostenol intramuscular, una o dos veces al día, abortaron 3-5 días después de comenzado el tratamiento (Douglas y col., 1974; Squires y col., 1980; Rathwell y col., 1987 citados por Paccamonti, 1991).

Otro aporte fue el trabajo de Daels y col. en donde seis yeguas, entre 82 y 102 días de preñez, fueron tratadas diariamente con 250 ug. de cloprostenol. El tiempo medio desde la primera inyección hasta la expulsión fetal fue de 48,6 ±5,6 horas y fueron requeridas 2,8±0,2 administraciones de cloprostenol (Daels y col., 1995).

Varios son los trabajos que respaldan que luego del segundo mes de gestación, es decir, luego del comienzo de la secreción de eCG, múltiples administraciones de PG o

sus análogos, tanto a intervalos de 12 como de 24 horas son requeridos para inducir el aborto en yeguas (Lofstedt, 1986; Voller y col., 1991; Ginther, 1992; Squires y Bosu, 1983 citados por Daels y col., 1995; Daels y col., 1996).

4.6.1 Mecanismo de acción de la prostaglandina o análogos

En la mayoría de los animales domésticos, los métodos para la terminación de la preñez están basados en la eliminación de la fuente de progesterona. En la yegua, durante los primeros 40 días, la gestación es mantenida por la progesterona secretada por el cuerpo lúteo materno y la administración de una única dosis luteolítica de PG F2 α o análogos es suficiente para causar la completa regresión luteal y terminar la preñez. Alrededor del día 40, y hasta los 100 - 150 días de gestación, se cree que la acción luteotrópica de la eCG estimula la continua secreción de esteroides por el cuerpo lúteo primario y el desarrollo de un cuerpo lúteo secundario (Daels y col., 1995).

A partir del segundo mes de gestación, la unidad feto-placentaria contribuye al pool de progestinas y estrógenos circulantes. Desde aproximadamente el día 70 de gestación, los cuerpos lúteos maternos ya no son necesarios para el mantenimiento de la preñez, aunque continúen secretando progesterona hasta los días 100 - 150. Holtan y col. observaron que luego de una ovariectomía al día 70 de gestación, 8 de 14 yeguas se mantuvieron preñadas (Holtan y col., 1979). Daels y col. realizaron ovariectomía a 5 yeguas al día 20 de gestación y suplementaron con progesterona (altrenogest) hasta el día 70 manteniéndose todas ellas preñadas (Daels y col., 1990). También Daels, realizó un estudio en donde 4 yeguas preñadas, en las cuales el cuerpo lúteo había regresado debido a una endotoxemia inducida experimentalmente continuaron normalmente con su gestación luego de suspender la suplementación con altrenogest en el día 70 de gestación a pesar de la ausencia de tejido luteal activo en los ovarios maternos (Holtan y col., 1979; Daels y col., 1990; Daels y col., 1991 citados por Daels y col., 1995).

En un reporte de Voller y col., 5 yeguas recibieron suplementación diaria con altrenogest y fueron tratadas cada 5 días con dosis luteolíticas de PG F2 α . En estas yeguas, el cuerpo lúteo primario regresó con la primera inyección de PG F2 α en el día 10 de preñez. Sin embargo, el cuerpo lúteo secundario no regresó consistentemente luego de la inyección y fue concluido que la PG F2 α falló en inducir la luteólisis completa debido a la presencia o desarrollo de tejido luteal inmaduro que no respondió al tratamiento. También es posible que la falla en inducir la luteólisis completa sea debido a los efectos luteotrópicos de la eCG (Voller y col., 1991 citado por Daels y col., 1995).

De trabajos previos se desprende que la completa eliminación del cuerpo lúteo funcional podría no ser el único factor en la producción del aborto, debido a que las yeguas ya no requieren de la progesterona luteal para el mantenimiento de la preñez. Es posible que el aborto sea el resultado de la combinación de la reducción de los niveles de progesterona y los efectos directos de la PG F2 α sobre el útero grávido (Daels y col., 1995).

Los mecanismos involucrados en la expulsión fetal siguen sin aclararse totalmente. En el modelo genérico para el comienzo del parto en las especies mamíferas influyen varios factores. Previo al comienzo del parto, los receptores de oxitocina (OX) y PG y

las uniones gap miometriales están presentes en bajos niveles. La ausencia de uniones gap es responsable del establecimiento de alta resistencia del músculo liso miometrial y pobre coordinación de las contracciones uterinas. Al parto, la aparición de gran número de uniones gap favorece significativamente la relación eléctrica en el miometrio y tiene un impacto crítico en la habilidad del mismo para desarrollar las contracciones sincronizadas y de alta amplitud que se dan en el parto. El número de receptores de OX se incrementa en el comienzo del parto, resultando en un aumento en la respuesta a la OX pituitaria. La OX activa las contracciones miometriales a través de la directa activación de las células miometriales y de la estimulación de la secreción de PG. Tanto la PG como la OX son potentes estimuladores de las contracciones miometriales. En adición, la PG podría también favorecer la formación de uniones gap, resultando en un aumento de la coordinación de las contracciones miometriales, e interactúa con el sistema de OX para favorecer el efecto de ambos agonistas. Aunque el rol relativo de la progesterona y estrógenos durante la iniciación del parto es poco claro y difiere entre especies, está generalmente aceptado que durante la preñez, la progesterona tiene un efecto inhibitor sobre la formación de uniones gap, receptores de OX, secreción uterina de PG y liberación de OX pituitaria, mientras que los estrógenos tienen un efecto opuesto. El comienzo del trabajo de parto no es debido únicamente a un aumento en la producción de estimuladores sino más bien a un cambio en la relación o balance de los agentes inhibidores y estimuladores. En experimentos realizados, la concentración de progesterona disminuyó seguido a la administración de cloprostenol, mientras que la concentración de estrógenos se mantuvo incambiada resultando en una variación de la relación progesterona/estrógenos. La disminución en la relación provee un ambiente que es más favorable para los cambios asociados al parto como aumento del número de uniones gap y de receptores de OX. Además de inducir condiciones que conducen a contracciones uterinas (uniones gap y ambiente esteroideo alterado), el cloprostenol podría también estimular la secreción de OX pituitaria que a su vez estimula la secreción endógena de PG F2 α por parte del útero y las contracciones del mismo. En yeguas no preñadas, la administración de PG F2 α estimula la secreción de OX pituitaria (Daels y col., 1993 citado por Daels y col., 1995) y las contracciones miometriales (Cadario y col., 1994; Troedsson y col., 1994 citados por Daels y col., 1995). Por ende, es posible que la secreción espontánea de PG F2 α en las horas previas a la expulsión fetal sea provocada por un cambio en la relación progesterona/estrógenos resultando en un aumento en la sensibilidad miometrial a la OX que resulta en la estimulación de la secreción de PG F2 α uterina y en contracciones miometriales. La hipótesis es soportada por los resultados de los experimentos de laboratorio que indican que la progesterona inhibe la PG F2 α endógena manteniéndose así la preñez (Daels y col., 1995).

En conclusión, los datos demostraron que el aborto inducido por cloprostenol está asociado con una secreción significativa de PG F2 α endógena. La expulsión fetal coincide con una secreción sostenida de PG F2 α . La expulsión fetal y la secreción de PG F2 α ocurren al mismo tiempo que la progesterona ha alcanzado bajos niveles (Daels y col., 1995).

La concentración de estrógenos conjugados no cambia significativamente durante los días que preceden al aborto sugiriendo que el feto se mantiene viable hasta poco antes de la expulsión fetal (Daels y col., 1995).

Los mecanismos involucrados en el aborto inducido por PG, son escasamente comprendidos y han sido revisadas varias explicaciones para la necesidad de aplicar repetidamente las dosis de PG F2 α . Es posible que, debido a una acción antiluteolítica de la eCG o el desarrollo de cuerpos lúteos secundarios, se requieran múltiples dosis de PG F2 α o análogos para alcanzar la completa luteólisis. Sin embargo, el hecho de que la preñez continúa en la ausencia de producción materna de progesterona (ejemplo: luego de una ovariectomía durante el segundo trimestre de gestación) no apoya el concepto de que se requiera una luteólisis completa para terminar la preñez en el segundo trimestre de gestación. El aborto, luego de múltiples dosis de PG F2 α , podría ser el resultado de un desvío en la relación progesterona/estrógeno subsecuente a la disminución en la producción de progesterona. El cambio en el ambiente esteroideo podría resultar en un aumento del número de receptores miometriales para OX y PGs; un aumento de la actividad enzimática de la prostaglandina-sintetasa y en la formación de uniones gap, resultando en un incremento de la contractilidad del miometrio. Bajo estas condiciones, es posible que la estimulación repetida del útero con PG F2 α exógena culmine con un efecto "forward loop" (retroalimentación), similar al mecanismo propuesto para el parto (Daels y col., 1996).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ANIMALES

Se utilizaron 37 yeguas cruza, entre 3 y 7 años de edad, con un peso promedio de 350 kg e identificadas con números marcados a fuego. Las yeguas fueron servidas por monta natural a campo, con padrillos cruza del mismo género y especie, las mismas no poseían antecedentes de patologías del tracto reproductivo ni subfertilidad. La totalidad de las yeguas utilizadas estaban preñadas al comienzo del experimento. Tanto el diagnóstico de preñez como la edad gestacional fueron determinados mediante palpación rectal, método por el cual es posible confirmar preñez a partir del día 20 aproximadamente (McKinnon, 1993). Las 37 yeguas cumplían con la condición de portar una gestación simple de 70-75 días, y a su vez tener una concentración sérica de eCG mayor a 30 UI/mL, de manera de evidenciar más fácilmente los posteriores cambios en la hormona.

5.2 TRATAMIENTOS

De las 37 yeguas, 31 fueron separadas al azar en 2 grupos, uno de 15 animales y otro de 16. El grupo control se formó posteriormente con 6 animales de la misma población. Al día 70 \pm 5 de gestación, se procedió a realizar la maniobra destinada a la interrupción de la gestación en los dos grupos tratados. El grupo I (n=16) fue tratado con un análogo de PG F2 α , cloprostenol (Estrumate®), a una dosis de 250 ug. por día durante tres días por vía intramuscular. En el grupo II (n=15) se realizó la maniobra mecánica de ruptura manual de anexos embrionarios por vía transcervical.

5.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Para la cuantificación de la concentración de eCG, las muestras de sangre fueron obtenidas por venopunción yugular mediante la utilización de aguja 18G y jeringas plásticas descartables. En los grupos tratados, se comenzó el día 70 ± 5 de gestación extrayéndose muestras cada 48 horas y finalizando 20 días después. En el grupo control, se comenzó el día 75 ± 5 extrayéndose muestras cada 5 días y finalizando el día 95 ± 5 de gestación.

La sangre fue transportada en forma individual en tubos secos de vidrio. Se los mantuvo a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 horas, para la formación del coágulo. Luego se los colocó en la heladera (5°C). En el laboratorio se procedió a la obtención del suero mediante centrifugación (centrífuga Rolco ® Modelo 1970-Industria Argentina). Cada muestra de suero fue dividida en dos y colocada en tubos Eppendorf (Medicor ®) identificados con el día de extracción correspondiente (0-10 para los grupos tratados, 0-4 para los controles) y número de yegua. Por último las muestras fueron conservadas en freezer (-18°C).

5.4 ANÁLISIS HORMONAL

Se utilizó la técnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para medir las concentraciones de eCG en todas las muestras de suero recolectadas. En el ensayo se empleó un kit comercial siguiendo las instrucciones del mismo. El mismo es un ELISA de fase sólida basado en el principio "sándwich". Los pocillos son revestidos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra un sitio antigénico único en la molécula de eCG. Una alícuota de muestra de suero conteniendo eCG endógena es incubada en el pocillo revestido. En un segundo paso una enzima conjugada (anticuerpo anti eCG conjugado a una peroxidasa) es incubada en los pocillos. El conjugado no unido es lavado. La cantidad de peroxidasa unida es proporcional a la concentración de eCG en la muestra. Habiendo agregado la solución sustrato, la intensidad de color desarrollada es proporcional a la concentración de eCG en la muestra. Luego se lee la absorbancia mediante un lector de micropocillos calibrado a $450 \pm 10\text{nm}$. El ensayo mostró un límite de sensibilidad de ± 10 UI eCG /mL.

5.5 OBSERVACIONES Y MANIOBRAS DE DIAGNÓSTICO

Los animales eran observados diariamente con el fin de evidenciar cualquier signo de expulsión fetal. Aquellos en los que la expulsión no pudo ser confirmada, fueron evaluados semanalmente mediante palpación rectal. De la misma manera eran evaluados los controles para controlar la permanencia del estado de gravidez.

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

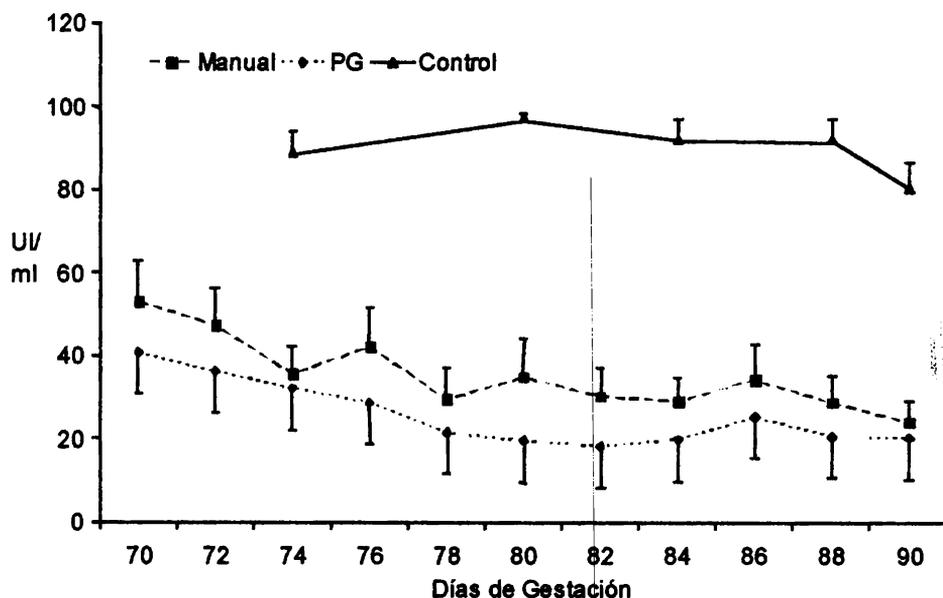
Los tres modelos (control, tratamiento hormonal y tratamiento manual) y sus correspondientes pendientes se sometieron a la prueba de hipótesis nula, siendo la H_0 = las pendientes son iguales y la H_1 = las pendientes son distintas.

Se realizó un modelo de regresión lineal múltiple con un nivel de significación $p < 0.05$. Se consideraron como variable dependiente o respuesta el nivel de hormona y como variables independientes el nivel inicial de la hormona, tratamiento de la yegua y días de período de estudio. Se ajustó un modelo teniendo en consideración además que los datos fueron medidas repetidas en el tiempo de los mismos animales, por lo tanto no asumimos que fueran independientes.

6. RESULTADOS

Las 31 yeguas comprendidas en los grupos tratados abortaron luego de ser sometidas a las maniobras destinadas a la interrupción de la gestación. En las 16 yeguas tratadas con análogo de PG F2 α fueron necesarias las tres dosis indicadas para terminar con la preñez. En algunos animales de este grupo pudieron observarse los efectos secundarios del cloprostenol (malestar abdominal y sudoración).

Figura 1. Concentraciones medias de eCG y errores estandar de los Grupos I, II y Grupo control en función del tiempo.



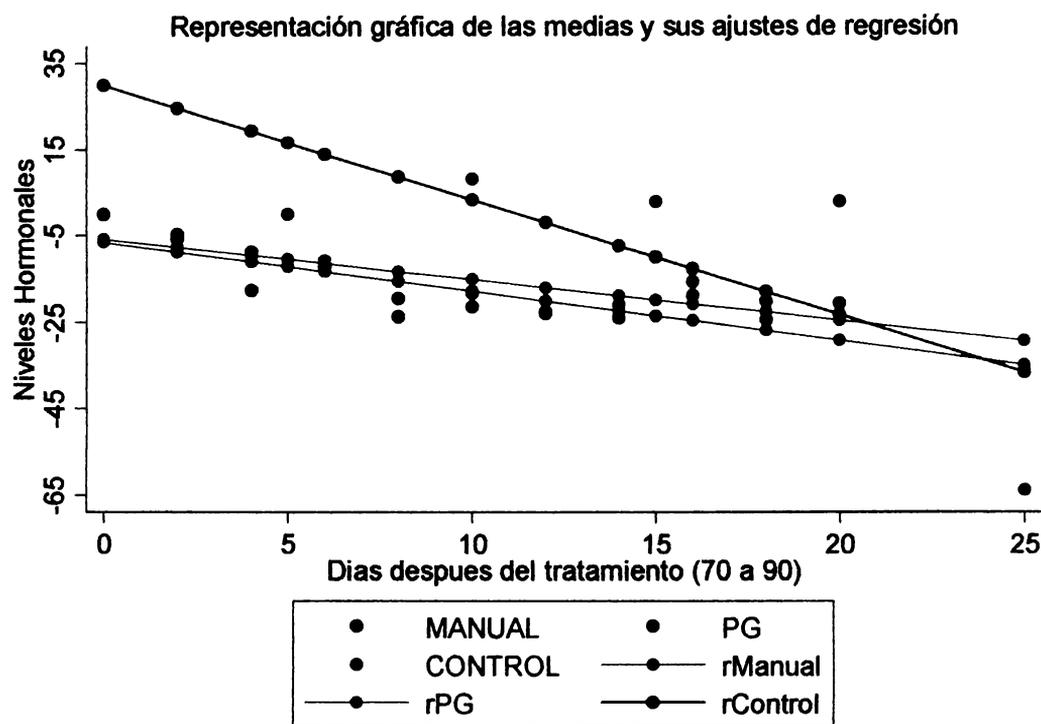
En la figura 1 se observa que el grupo control presentó al día 75, niveles evidentemente mas altos en comparación con ambos grupos tratados. En este grupo no pudo evidenciarse claramente una disminución de la hormona hasta el día 88 de gestación.

Tanto en el grupo I como en el grupo II existió una disminución de la hormona en función del tiempo.

Se aprecia además que las concentraciones de eCG siempre fueron menores en los grupos tratados en comparación con el grupo control, aunque la hormona se mantuvo con niveles detectables.

De la gráfica se desprende además que los grupos I y II presentaron errores estandar apreciables.

Figura 2. Regresiones lineales de los Grupos I, II y Grupo control (valor 0 = valor inicial)



Se realizó un modelo de regresión lineal para cada uno de los tratamientos (Grupo I, Grupo II y Grupo control).

Se tenían tres modelos y tres pendientes y se sometieron a hipótesis para ver si eran diferentes, siendo las hipótesis: H_0 = las pendientes son iguales; H_1 = las pendientes son diferentes. En ninguno de los casos pudimos rechazar la H_0 .

Como no se tenían elementos para decir que había un comportamiento distinto entre los grupos, entonces pudimos incluir a los tres grupos en un mismo modelo (Figura 2). El mismo fue un modelo de regresión lineal múltiple, con un nivel de significación de $P < 0.05$. Se consideraron como variable dependiente o respuesta el nivel de hormona y como variables independientes el nivel inicial de la hormona, tratamiento de la yegua y

días de período de estudio. Se ajustó un modelo teniendo en consideración, además, que los datos corresponden a medidas repetidas de los mismos animales, y por lo tanto no asumimos que fueran independientes. Cuando se corrió el modelo, todas las variables fueron significativas. El coeficiente para días (β_1) fue negativo, es decir que a medida que transcurre el tiempo la hormona cae. El tratamiento fue expresado en dos variables “dummies” que tomaron como referencia el tratamiento hormonal. La 1ª variable representa el efecto del tratamiento manual, que no fue diferente con respecto al hormonal y la 2ª variable expresa el comportamiento del grupo control con respecto al hormonal, arrojando una diferencia altamente significativa, por consiguiente el control tuvo valores más altos.

HGC	Coef.	Robust Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
D_in	.4557625	.0509903	8.94	0.000	.3523495	.5591756
_ITRAT_1	3.946557	4.084339	0.97	0.340	-4.336866	12.22998
_ITRAT_2	44.78686	6.471272	6.92	0.000	31.66251	57.91121
días	-1.005859	.2393444	-4.20	0.000	-1.491272	-.5204459
_cons	17.29584	3.840346	4.50	0.000	9.507262	25.08443

Cuadro 1. Regresión de los niveles hormonales por tratamiento (manual y hormonal) y días

7. DISCUSIÓN

Los hallazgos obtenidos coinciden con los de Allen (1975), Squires y col. (1980), Lofstedt (1986), Jeffcott y col. (1987), McKinnon (1993), Ginther (1998), Daels y col. (1991) citados por Allen (2003), los cuales aseveran que la eCG es detectable luego del aborto entre los días 35 y 120 siendo responsable de falsos positivos en el diagnóstico de preñez. Además nuestro trabajo afirma que la presencia de la hormona en sangre es un hecho confirmatorio de que hay o hubo una gestación de por lo menos 35 días, pero que este método de diagnóstico de gestación no permite aseverar la persistencia de la preñez. A diferencia de lo expuesto por Lanzzeri y col. (2001) la hormona eCG persiste en la sangre materna luego de la pérdida de la gestación por lo que su medición no es una herramienta fiable para el diagnóstico de reabsorción embrionaria.

Fundamentalmente las yeguas de ambos grupos tratados mostraron importante variación individual en sus niveles séricos de eCG para iguales días de extracción igualmente a lo reportado por Allen y Stewart (1993), Vivo Rodríguez (1997), Allen (2000 y 2003).

Observando la curva de regresión correspondiente al grupo control coincidimos con Cole y Hart (1930), Allen (1969 y 1975), Allen y Stewart (1993), Allen (2001), Allen y Stewart (2001) y Allen (2003) en que a partir del día 60-70 de gestación, la concentración sérica de eCG comienza a declinar debido a la degeneración de las copas endometriales.

Los resultados de nuestro trabajo se asemejan a los obtenidos por Mitchell (1971), Mitchell y Betteridge (1972), Mitchell y Allen (1975), Squires y col. (1980), Jeffcott y col. (1987), Lofstedt (1986), Daels y col. (1991) citados por Allen (2003), McKinnon (1993), Ginther (1998) y Allen (2003), en cuanto a que la hormona eCG se mantuvo detectable en sangre durante los días posteriores al aborto.

En nuestro ensayo obtuvimos resultados similares a los hallados por Fey y Douglas (1982), quienes observaron que las concentraciones en plasma de eCG fueron menores en yeguas que abortaron que en aquellas yeguas que mantuvieron normalmente la gestación. Darenius (1987) también publicó que la producción de eCG disminuyó levemente cuando el feto murió después de la formación de las copas endometriales.

A pesar de que estos últimos autores apoyan nuestros resultados, las últimas investigaciones afirman que las copas endometriales son estructuras independientes del feto y sus membranas y por ende la capacidad de producción de eCG no se ve alterada luego que se produce la interrupción de la preñez cualquiera sea el método (Allen, 1969 citado por Mitchell y Allen, 1975; Jeffcott y col., 1987; Ginther, 1998 y Daels y col., 1991 citados por Allen, 2003). De acuerdo a esto, no esperábamos las diferencias encontradas entre los controles y los grupos con tratamientos asumiendo que éstas quizás puedan deberse al escaso número de yeguas que conformaban el grupo control. Observando las gráficas y comparando con los resultados obtenidos por Huber y col. (1993), entendemos que los tratamientos no afectan drásticamente las copas endometriales. En este último trabajo, donde se removió quirúrgicamente el tejido endometrial, los niveles de eCG cayeron a la mitad de su concentración inicial

en solo 6 días aproximadamente con una marcada pendiente. En nuestro trabajo las pendientes no fueron tan pronunciadas y no hubo diferencias entre la correspondiente al grupo control y las correspondientes a los grupos tratados.

Encontramos que la preñez puede ser efectivamente terminada por la penetración manual del tapón cervical, posterior dilatación del cérvix y ruptura del alantocorion, ya que todas las yeguas sometidas a esta maniobra abortaron, en concordancia con Lofstedt (1986) y Carbo y col. (1987).

Igualmente a lo observado por Douglas y col. (1974), Squires y col. (1980), Squires y Bosu (1983), Lofstedt (1986), Rathwell y col. (1987), Varner y col. (1988), Kasman y col. (1988), Voller y col. (1991), Ginther (1992), Daels y col. (1995) y Daels y col. (1996), luego del comienzo de la secreción de eCG, múltiples inyecciones de un análogo de prostaglandina a intervalos de 24 horas fueron requeridas para terminar la preñez.

Al no haber encontrado diferencias significativas entre ambos grupos tratados en cuanto a la concentración de eCG en el tiempo, coincidimos con Lofstedt (1986) en que la terapia con prostaglandinas (o análogos) parece no tener efecto en la función de las copas endometriales.

No existen antecedentes de trabajos que comparen la eficacia de ambos métodos de interrupción de preñez ni la dinámica de la hormona eCG luego de su realización. En este estudio ambos métodos fueron igualmente eficaces ya que todas las yeguas abortaron sin inconvenientes. El comportamiento de los niveles séricos de eCG no presentó diferencias significativas al comparar ambos grupos por lo que se pudo determinar que no existe influencia del método en la dinámica de la eCG.

8. CONCLUSIONES

La medición de eCG no es una herramienta fiable para el diagnóstico de gestación ni para el diagnóstico de reabsorción embrionaria. La hormona permanece detectable en la sangre materna durante al menos 20 días luego de interrumpir una gestación de 70-75 días.

Los perfiles hormonales de las yeguas control presentaron diferencias significativas con los de las yeguas de los grupos tratados, por lo tanto la inducción del aborto alteraría la dinámica de la eCG, aunque la hormona permanece detectable durante al menos 20 días luego de la interrupción de la gestación.

La preñez puede ser efectivamente terminada tanto mediante el método manual como a través de la administración de un análogo de prostaglandina. En el caso de este último es necesario aplicar tres inyecciones a intervalos de 24 horas. Por lo tanto el método manual representa una herramienta más económica.

No existen diferencias entre ambos métodos cuando comparamos la dinámica de eCG luego de su realización.



9. BIBLIOGRAFÍA

1. Allen WR. (1975) The influence of fetal genotype upon endometrial cup development and PMSG and progesterone production in equids. *J. Reprod. Fert.*; 23: 405-413.
2. Allen WR. (1994) Use of laser surgery to ablate endometrial cysts, endometrial cups and transluminal adhesions in the uteri of mares. *Ars. Veterinaria*; 10 (2): 59-66.
3. Allen WR. (2000) The Physiology of Early Pregnancy in the Mare. *AAEP Proceeding*; 46:338-354.
4. Allen WR. (2001) Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction*; 121:513-527.
5. Allen WR. (2003) Development and functions of the equine placenta. *Proceedings of a workshop on the equine placenta. Lexington, Kentucky, USA.* pp 20-33.
6. Allen W, Stewart F. (1993) Equine Chorionic Gonadotrophin. En: McKinnon AO, Voss JL. *Equine Reproduction*. Philadelphia, Lea & Febiger, pp. 81-96.
7. Allen W, Stewart F. (2001) Equine placentation. *Reprod. Fertil. Dev.*; 13:623-634.
8. Allen W, Stewart F, Antczak DF. (1999) Factors controlling growth and development of equine placenta and maternal responses to these changes. *Proc. of a Workshop on Fetomaternal control of pregnancy. Barbados, West Indies.* pp 31-33.
9. Allen WR, 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. Journal of Endocrinology*; 172:237-246.
10. Carbo A, Fernández A, Elhordoy D. (1987) Ruptura manual de la bolsa corioalantoidea como método de aborto inducido en yeguas. *Resúmenes del IV Congreso Nacional de Veterinaria. Montevideo, Uruguay. Sección III (sin página).*
11. Daels PF, Besognet B, Hansen B, Mohammed H, Odensvik K, Kindahl H. (1996). Effect of progesterone on prostaglandin F_{2α} secretion and outcome of pregnancy during cloprostenol-induced abortion in mares. *AJVR*; 57(9): 1331-1337.
12. Daels PF, Mohammed H, Montavon SME, Stabenfeldt GH, Hughes JP, Odensvik K, Kindahl H. (1995) Endogenous prostaglandin secretion during

cloprostenol-induced abortion in mares. *Animal Reproduction Science*; 40:305-321.

13. Darenius K, Kindahl H, Madej A. (1987) Clinical and endocrine aspects of early fetal death in the mare. *J. Reprod. Fert*; 35: 497-498.
14. Douglas RH, Squires EL, Ginther OJ. (1974) Induction of abortion in mares with PG F2 alpha. *Journal of Animal Science*; 39 (2): 404-407.
15. Flood PF (2003) The placenta of the mare: An eclectic overview Proceedings of a workshop on the equine placenta. Lexington, Kentucky, USA. pp 16 -19.
16. Ginther OJ. (1992) Reproductive biology of the mare-Basic and applied aspects. 2nd Edition, Equiservices, Cross Plains, Wisconsin, USA, 642 pp.
17. Ginther OJ. (1998) Equine pregnancy: Physical interactions between the uterus and conceptus. *AAEP Proceedings*; 44: 73-104.
- 18. Huber MJ, Roser FJ, Riebald TW, Schmotzer WB, Grubb TL, Crisman RO. (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 -114.
19. Jeffcott LB, Hyland JH, MacLean AA, Dyke T, Robertson Smith G. (1987) Changes in maternal hormone concentrations associated with induction of fetal death at day 45 of gestation in mares. *J. Reprod. Fert.*; 35: 461-467.
20. Kasman LH, Hughes HP, Stabenfeldt GH, Starr MD, Lasley BL (1998) Estrone sulphate concentrations as an indicator of fetal demise in the horse. *Am. J. Vet. Res*; 49:184-187.
- 21. Lanzzeri S, Martínez EB, Gama S. (2001) Determinación de niveles séricos de Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) durante la gestación de la yegua por Radioinmunoanálisis. *Veterinaria, (Montevideo)*; 36 (144 -145): 11-16.
22. Lofstedt RM. (1986) Termination of unwanted pregnancy in the mare. En: Morrow DA. *Current therapy in theriogenology*. 2^o Ed. Philadelphia, WB Saunders Co.pp.715 – 718.
23. McKinnon AO. (1993) Diagnosis of pregnancy. En: McKinnon AO, Voss JL. *Equine Reproduction*. Philadelphia, Lea & Febiger. pp.501-508.
24. Mitchell D, Allen WR. (1975) Observations on reproductive performance in the yearling mare. *J. Reprod. Fert.*; 23: 531-536.

25. Montavon SME, Daels PF, Stabenfeldt GH, Odensvik K, Hughes JP. (1991) The role of endogenous prostaglandin release in abortion in mares induced by PG F2 α analogue administration. *J. Reprod. Fert.*; 44: 724-725.
26. Paccamonti DL. (1991) Elective termination of pregnancy in mares. *JAVMA*; 198 (4): 683 - 689.
27. Ragon AC. (1997) Induced abortion. En: Youngquist RS. *Current therapy in large animal theriogenology*. Philadelphia, WB Saunders Co, p.177
28. Rathwell AC, Asbury AC, Hansel PJ, Archbald LF. (1987) Reproductive function of mares given PG F-2 α daily from day 42 of pregnancy. *J. Reprod. Fert.*; 35: 507-508.
29. Silva MIF, Nascimento EF, Cassali GD. (1995) Persistência de cálices endometriais na égua: Relato de Caso. *Arq. Bras. Med.Vet. Zootec.*; 47(1): 31-36.
30. Squires EL, Bosu WTK (1993) Induction of abortion during early to midgestation En: McKinnon AO, Boss JL. *Equine Reproduction*. Lea&Febiger, Philadelphia, pp. 563-566.
31. Squires EL, Hillman RB, Pickett BW, Nett TM. (1980) Induction of abortion in mares with Equimate: effect on secretion of progesterone, PMSG and reproductive performance. *Journal of Animal Science*; 50(3): 490-495.
32. Stewart F. (1996) Roles of mesenchymal–epithelial interactions and hepatocyte growth factor-scatter factor (HGF-SF) in placental development. *Reviews of Reproduction*; 1:144–148.
33. Stewart F, Mathias S, Allen WR. (1999) Origins of the allantois and the role of allantoic mesenchyme in development of the equine chorionic girdle. *Proc. of a Workshop on Fetomaternal control of pregnancy*. Barbados, West Indies. pp.26-27.
34. Stout SS, Stewart F, Allen WR. (2003) Development of the equine chorionic girdle: a role for allantoic mesenchyme? *Proc. of a Workshop on Embryonic and fetal nutrition*. Ravello, Italia. pp. 36-38.
35. Varner DD, Meyers PJ, Evans JW, Wiest JJ, Kloppe LH, Elmore RG. (1988) Effect of abortifacient on fetal viability and post –abortion reproductive performance. *Proc. 11th Int. Cong. Anim. Reprod. & A.I.* Dublin, Ireland. pp.130.
36. Vivo Rodríguez R. (1997). *Reproducción en equinos*. En: García Sacristán A. *Fisiología Veterinaria*. Philadelphia. Ed. Saunders WB Co. pp. 915-927.

37. Voller BE, Parry Weeks LC, Holtan DW. (1991) The effect of Regu-Mate, a synthetic progestin on early pregnancy maintenance, conceptus growth, and corporalutea development in pregnant pony mares. J. Equine. Vet. Sci; 11: 46-50.
38. Volkman D. (2002) Hormonal function in mares suffering from Mare Reproductive Loss Syndrome. <http://web.vet.cornell.edu/public/research/zweig/volkmann02.html>
39. Willis LA, Riddle TW. (2005) Theriogenology question of the month. JAVMA; 226(6): 877-879.
40. Zent WW. (2002). An overview of reproductive system changes during and after Mare Reproductive Loss Syndrome. Proceedings of the First Workshop on Mare Reproductive Loss Syndrome. Kentucky, USA. pp. 30-31.