

# Desarrollo folicular, concentraciones de FSH, estradiol y MPGF $\alpha$ asociado con persistencia lútea inducida por la administración de líquido folicular equino libre de esteroides en la oveja

## Follicular development, concentrations of FSH, estradiol and MPGF2 $\alpha$ associated with luteal persistence induced by the administration of steroid-free equine follicular fluid in the ewe

Joel Hernández Cerón \*  
Luis Zarco Quintero \*  
Hans Kindahl \*\*  
Javier Valencia Méndez \*

---

### Abstract

The administration of steroid-free equine follicular fluid (EFF) on follicular development, FSH, estradiol, MPGF2 $\alpha$  and length of the cycle was evaluated during diestrus in ewes. Forty one previously synchronized ewes were used. Two groups were formed on day 11 of the oestrous cycle: EFF Group (n = 24) received 3 ml of EFF iv every 8 h until the next oestrus. The control group (n = 17) received 3 ml iv of saline solution every 8 h until oestrus. Progesterone levels were determined in daily blood samples obtained during the oestrous cycle. From day 12 onwards, FSH concentration was determined in blood samples taken at 2 h intervals in 5 ewes of each group. In samples from 2 ewes of each group, levels of MPGF2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$  metabolite) were also measured. Eight ewes of the EFF group and 7 of the control group were ovariectomized on day 14, in order to measure follicular size and estradiol concentration in the aspirated follicular liquid. Luteal phase and length of the oestrous cycle were longer (P < 0.05) in the EFF group (13.5  $\pm$  0.53 and 19.5  $\pm$  0.66 days respectively) than in the control group (12.2  $\pm$  0.32 and 17.7  $\pm$  0.26 days respectively). FSH levels were lower (P < 0.05) in the EFF group than in the control one. Follicular size and estradiol were lower in the EFF group (2.62  $\pm$  0.14 mm; 4.35  $\pm$  2.3 ng/ml) than in the control one (3.42  $\pm$  0.20 mm; 34.8  $\pm$  12.15 ng/ml). Ewes in the control group showed 5 MPGF2 $\alpha$  pulses at 8  $\pm$  3.2 h intervals from day 15 to 17, whereas one EFF ewe presented 5 pulses between days 14 to 17 at 14  $\pm$  2.3 h, intervals and the other EFF ewe had 4 pulses from day 14 to 20 at 22  $\pm$  12 h intervals. It is concluded that EFF reduced FSH secretion that caused the presence of small follicles and lower estradiol concentrations that lengthened the luteal phase, probably through changes in the pattern of PGF2 $\alpha$  secretion.

**Key words: EQUINE FOLLICULAR FLUID, LUTEAL PERSISTENCE, LUTEOLYSIS.**

### Resumen

Se evaluó el efecto de la administración de líquido folicular equino libre de esteroides (LFE) sobre el desarrollo folicular, concentraciones de FSH, estradiol, MPGF2 $\alpha$  y la duración de la fase lútea en ovejas durante el diestro. Se utilizaron 41 ovejas previamente sincronizadas. El día 11 del ciclo estral se formaron dos grupos: el grupo LFE (n = 24) recibió 3 ml de LFE iv cada 8 h hasta que las ovejas mostraron el siguiente estro. El grupo testigo (n = 17) recibió 3 ml iv de solución salina fisiológica cada 8 h hasta la presentación del estro. Durante todo el ciclo estral se obtuvieron muestras sanguíneas diariamente para la determinación de los niveles de progesterona. A partir del día 12, en cinco ovejas de cada grupo

---

Recibido el 18 de abril de 2003 y aceptado el 30 de septiembre de 2003.

\* Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F. Correo electrónico: jhc@servidor.unam.mx

\*\* Department of Obstetrics and Gynaecology, Centre for Reproductive Biology, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Uppsala, Sweden.

se colectaron muestras sanguíneas cada 2 h durante cinco días, en las cuales se midieron las concentraciones de FSH. En las muestras de dos ovejas de cada grupo se midió además el metabolito de la PGF2 $\alpha$  (MPGF). El día 14, ocho ovejas del grupo LFE y siete del testigo fueron ovariectomizadas; se midió el diámetro de los folículos visibles y se aspiró el líquido folicular para determinar las concentraciones de estradiol. Tanto la longitud de la fase lútea como del ciclo estral fueron mayores ( $P < 0.05$ ) en el grupo LFE ( $13.5 \pm 0.53$  y  $19.5 \pm 0.66$  días, respectivamente) que en el testigo ( $12.2 \pm 0.32$  y  $17.7 \pm 0.26$  días). Los niveles de FSH fueron menores en el grupo LFE ( $P < 0.05$ ). El diámetro folicular y la concentración de estradiol fueron menores ( $P < 0.05$ ) en el grupo LFE ( $2.62 \pm 0.14$  mm;  $4.35 \pm 2.3$  ng/ml) que en el testigo ( $3.42 \pm 0.20$  mm;  $34.8 \pm 12.15$  ng/ml). Durante los días 15 a 17, las ovejas del grupo testigo mostraron cinco pulsos de MPGF2 $\alpha$  con intervalos promedio de  $8 \pm 3.2$  h, mientras que de las ovejas tratadas con LFE, una presentó cinco pulsos entre los días 14 a 17 con una frecuencia entre ellos de  $14 \pm 2.3$  h, y la otra tuvo cuatro pulsos entre los días 14 a 20, con un intervalo promedio de  $22 \pm 12$  h. Se concluye que el tratamiento con LFE redujo la secreción de FSH, lo que originó folículos ováricos de menor tamaño y con menores concentraciones de estradiol, con un alargamiento de la fase lútea, posiblemente debido a una modificación del patrón de secreción de la PGF2 $\alpha$ .

**Palabras clave:** LÍQUIDO FOLICULAR EQUINO, PERSISTENCIA LÚTEA, LUTEOLISIS.

## Introduction

In the ewe the oestrous cycle length is closely related to the luteal phase length, and particularly to the moment in which the pulsatile pattern of prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) secretion is established, resulting in CL regression.<sup>1</sup> PGF2 $\alpha$  secretion is regulated by complex interactions between the CL, ovarian follicles and the uterus. An initial exposure to progesterone during ten to 12 days is needed before estradiol receptors can appear in the endometrium. Once this has occurred estradiol produced by the dominant follicles stimulates the synthesis of oxytocin receptors in the endometrium so that oxytocin can now act in the uterus to induce the release of PGF2 $\alpha$ .<sup>2</sup>

The length of the luteal phase can be controlled through manipulation of the events that lead to PGF2 $\alpha$  release. In this regard, delaying CL regression has practical implications, particularly in those cycles characterized by premature CL regression, such as those following the first postpartum, pubertal or seasonal ovulations.<sup>3,4</sup> Delayed CL regression could also be useful when a transferred embryo is too young for the stage of the receptor ewe,<sup>5</sup> or in those infertility cases due to a reduced embryo capability to signal pregnancy recognition on time.<sup>6</sup> In all these cases, delaying the onset of luteolysis would provide embryos with more time to signal their presence to the mother on time to activate the maternal recognition of pregnancy and would increase pregnant rates.

The suppression of the estradiol source through the physical elimination of ovarian follicles has resulted in delayed CL regression in the ewe<sup>7,8</sup> and the cows.<sup>9</sup> A more practical alternative could be the suppression of follicular development through the administration of a rich source of inhibin.<sup>10</sup> This hormone inhibits FSH secretion at pituitary level,<sup>11,12</sup>

## Introducción

La longitud del ciclo estral en la oveja está estrechamente relacionada con la duración de la fase lútea y particularmente con el momento en que se establece un patrón de secreción pulsátil de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ), que provoca la regresión del cuerpo lúteo.<sup>1</sup> La secreción de PGF2 $\alpha$  es regulada por complejas interacciones entre el cuerpo lúteo, los folículos ováricos y el útero. Inicialmente es necesaria una exposición a progesterona durante diez a 12 días para que aparezcan receptores de estradiol en el endometrio. Después el estradiol producido por los folículos, y particularmente por él o los folículos dominantes, estimula en el endometrio la síntesis de receptores para oxitocina, con lo cual la oxitocina puede actuar en el útero desencadenando la secreción de PGF2 $\alpha$ .<sup>2</sup>

La longitud de la fase lútea se controla mediante la manipulación de eventos que conducen a la liberación de la PGF2 $\alpha$ . Así, al retrasarse la regresión del cuerpo lúteo se tienen implicaciones prácticas, en especial en los ciclos que se caracterizan por la formación de cuerpos lúteos de vida corta, como en la primera ovulación posparto, puberal y de la época reproductiva.<sup>3,4</sup> También se aplica en hembras a las que se les transfiere un embrión de menor edad en relación con la receptora,<sup>5</sup> o en casos de infertilidad cuando el embrión tiene disminuida su capacidad para promover oportunamente el reconocimiento materno de la gestación.<sup>6</sup> Así, el retraso de la luteolisis daría más tiempo a los embriones para establecer los mecanismos que rescaten el cuerpo lúteo; en consecuencia, los porcentajes de gestaciones se favorecerían.

La supresión de la fuente de estradiol mediante la eliminación física de los folículos ováricos retrasa la regresión del cuerpo lúteo tanto en ovejas<sup>7,8</sup> como en vacas.<sup>9</sup> Una alternativa práctica para retrasar el

thus resulting in the suppression of follicular growth and estradiol production.<sup>13-15</sup> Inhibin is found in high concentrations in equine follicular fluid.<sup>16</sup> In mares, administration of equine follicular fluid that was previously treated to remove steroid hormones<sup>17</sup> caused a marked suppression of FSH secretion and follicular growth. Hernandez *et al.*<sup>18</sup> were able to significantly reduce the FSH concentration in ewes that received steroid-free equine follicular fluid (EFF).

If EFF is capable of reducing follicular estrogen production in diestrous ewes, it could avoid the establishment of the pulsatile pattern of PGF2 $\alpha$  secretion that is needed to induce CL regression, and this would lengthen the luteal phase.

The objective of this work was to evaluate the effect of EFF administration during diestrus on the secretion of FSH, follicular development, estradiol concentrations, MPGF2 $\alpha$  secretion and luteal phase length in the ewe.

## Material and methods

This study was carried out at an experimental farm located close to México City. The weather of this region is type c(w) (w)b (ij), that corresponds to semi-cold-semihumid with rain-showers during summer and rainfalls of 800 to 1200 mm.<sup>19</sup> The experiment took place in September and October, months that coincide with the reproductive season of sheep in Mexico.<sup>20</sup>

### Preparation of the equine follicular fluid

The equine follicular fluid was collected from ovaries at a local slaughterhouse. This fluid was obtained by sterile aspiration of visible follicles immediately after slaughter, and was refrigerated until arriving to the laboratory. The fluid was processed in order to eliminate the steroid hormones according to the method described by Hernandez *et al.*<sup>18</sup>

Estradiol and progesterone concentrations in the follicular fluid before processing were 760 ng/ml and 124 ng/ml respectively, and after treating the fluid they were 0.4 ng/ml and 0.02 ng/ml respectively, so that removal of more than 99% of both steroid hormones was achieved.

### Experimental design

Forty-one adult Hampshire and Suffolk ewes were used. They all had at least two previous oestrous cycles before the beginning of the experiment. The ewes were synchronized by the insertion of an intravaginal sponge impregnated with 45 mg of flurogestone acetate.\* Sponges were retrieved 12 days after their insertion, and 2 days prior to removing the sponges the animals were intramuscularly injected with 15 mg of PGF2 $\alpha$ .\*\* Detection of oestrus was done twice a day using a male fitted with an apron. The onset of oestrus was considered as day 0 of the cycle.

inicio de la luteolisis en rumiantes es suprimir el desarrollo folicular mediante la administración de una fuente rica en inhibina.<sup>10</sup> Esta hormona inhibe la secreción de la hormona folículo-estimulante (FSH) a nivel hipofisiario,<sup>11,12</sup> ello resulta en la supresión del crecimiento folicular y la producción de estradiol.<sup>13-15</sup> La inhibina se encuentra en concentraciones elevadas en el líquido folicular equino;<sup>16</sup> en yeguas se suprimió la secreción de FSH y el crecimiento folicular al administrar líquido folicular previamente tratado para remover las hormonas esteroides (LFE).<sup>17</sup> En ovejas, Hernández *et al.*<sup>18</sup> suprimieron las concentraciones de FSH al recibir LFE, lo que permite utilizarlo en esta especie como fuente biológicamente activa de inhibina.

La capacidad del LFE para reducir la producción folicular de estrógenos en la oveja diéstrica, evita el establecimiento del patrón de secreción pulsátil de PGF2 $\alpha$  necesario para inducir la regresión del cuerpo lúteo, ello propiciaría alargamiento de la fase lútea.

Aquí se evalúa el efecto de la administración de líquido folicular equino libre de esteroides sobre la secreción de FSH, desarrollo folicular, concentraciones de estradiol, secreción de MPGF2 $\alpha$  y la longitud de la fase lútea de ovejas diéstricas.

## Material y métodos

Este trabajo se realizó en una granja experimental cerca de la ciudad de México. El clima es de tipo c(w) (w)b (ij), que corresponde a semifrío-semihúmedo, con lluvias en verano y precipitación anual de 800 a 1200 mm.<sup>19</sup> El experimento se realizó durante los meses de septiembre y octubre, en plena época reproductiva de ovinos.<sup>20</sup>

### Preparación del líquido folicular equino

El líquido folicular fue colectado de ovarios de yeguas sacrificadas en un rastro local. Después del sacrificio se succionó en forma estéril el líquido de los folículos visibles, que se conservó en refrigeración hasta llegar al laboratorio. Posteriormente el líquido folicular fue procesado para eliminación de hormonas esteroides de acuerdo con lo establecido en el método descrito por Hernández *et al.*<sup>18</sup>

Las concentraciones de estradiol y progesterona en el líquido folicular antes del procesamiento fueron de 760 ng/ml y 124 ng/ml, y después del tratamiento de 0.4 ng/ml y 0.02 ng/ml, respectivamente, ya que la técnica utilizada permitió remover más del 99% de ambas hormonas esteroides.

### Diseño experimental

Se utilizaron 41 ovejas adultas de las razas Hampshire y Suffolk que habían presentado dos estros previos al inicio del experimento. Las ovejas se sincronizaron mediante la inserción de una esponja intravaginal

On day 11 after the synchronized oestrus, two groups were formed at random: EFF (n = 24) and control (n = 17).

Starting on day 11, the ewes in EFF group received 3 ml of EFF i.v. every 8 h for 10 days or until showing oestrus. The ewes in the control group received saline solution instead of EFF.

Blood samples for progesterone determination were taken from all ewes daily from day 0 until the presentation of the following oestrus. Progesterone was determined by solid phase radioimmunoassay.<sup>21</sup> Furthermore, blood samples were obtained from 5 ewes of each group every 2 h from day 12 until the onset of the following oestrus. FSH concentrations were determined in these samples using a liquid phase heterologous radioimmunoassay.<sup>18</sup>

Concentrations of the PGF2 $\alpha$  metabolite (15-keto-13,14 dihydro PGF2 $\alpha$ )<sup>22</sup> were determined in the samples from 2 sheep of the EFF group, in which there was an evident delay of luteolysis, and in two ewes of the control group with a normal luteal phase.

All samples were obtained from the jugular vein using heparinized vacutainer tubes. After their collection, samples were centrifuged at 1500 g for 10 minutes in order to separate the plasma, which was preserved at -20°C until its analysis.

On day 14 of the cycle, eight ewes of the treated group and seven of the control one were ovariectomized. Visible follicles were counted and measured and the fluid of the largest follicles was aspirated. The aspirated fluid was diluted (1:50) with a phosphate-buffered saline solution (PBS) in order to determine estradiol concentrations through solid-phase radioimmunoassay.<sup>23</sup>

The onset of the luteal phase was considered when progesterone concentrations increased above 1 ng/ml, and its end when they declined to less than 1 ng/ml.<sup>1</sup> The number of PGF2 $\alpha$  pulses and the interval between them was calculated according to the method described by Zarco *et al.*<sup>24</sup>

Progesterone and FSH concentrations were compared through variance analysis for repeated measures. Luteal phase length, follicular estradiol concentrations and follicle size were compared between groups through a Student's "t" test.

## Results

### **FSH and estradiol concentrations and follicular growth**

All results are expressed as mean standard error. FSH concentrations between days 12 and 16 were significantly lower ( $P < 0.05$ ) in the ewes treated with EFF than in the control ones (Figure 1). Both the average diameter of the ovarian follicles and the estradiol concentration in the follicular fluid were significantly lower ( $P < 0.05$ ) in the ewes of the treated group ( $2.62 \pm 0.14$  mm;  $4.35 \pm 2.3$  ng/ml), than in those

impregnada con 45 mg de acetato de fluorogestona.\* Las esponjas se retiraron 12 días después de la inserción, dos días antes de remover las esponjas se inyectaron 15 mg de PGF2 $\alpha$ \*\* por vía intramuscular. La detección de estros se realizó dos veces al día utilizando un macho con mandil. El inicio del estro se consideró como el día cero del ciclo; el día 11, subsiguiente al estro sincronizado, se formaron aleatoriamente dos grupos: LFE (n = 24) y testigo (n = 17).

A partir del día 11 las ovejas del grupo tratado recibieron 3 ml de LFE por vía intravenosa cada ocho horas durante diez días o hasta presentar el estro. El grupo testigo recibió solución salina fisiológica en lugar de LFE.

Se tomaron muestras de sangre para la determinación de progesterona en todas las ovejas diariamente desde el día cero hasta la presentación del siguiente estro. La progesterona se determinó mediante radioinmunoanálisis en fase sólida.<sup>21</sup> Además en cinco ovejas de cada grupo se obtuvieron muestras de sangre cada 2 h a partir del día 12 hasta la presentación del estro. En dichas muestras se determinaron las concentraciones de FSH usando radioinmunoanálisis heterólogo en fase líquida.<sup>18</sup>

En las muestras de dos ovejas del grupo LFE en las que fue evidente un retraso en la luteolisis y en dos ovejas del grupo testigo donde se observó una fase lútea de duración normal, se determinaron las concentraciones del metabolito de la PGF2 $\alpha$  (15-ceto-13,14 dihidro PGF2 $\alpha$ ).<sup>22</sup>

Todas las muestras se obtuvieron de la vena yugular utilizando tubos heparinizados al vacío. Después de su obtención, las muestras se centrifugaron a 1500 g durante diez minutos para la separación del plasma, que se conservó a -20°C hasta su análisis.

El día 14 del ciclo, ocho ovejas del grupo tratado y siete del testigo fueron ovariectomizadas. En los ovarios así obtenidos se contaron y midieron los folículos visibles, posteriormente se aspiró el líquido de los folículos más grandes. El líquido de los folículos aspirados se diluyó (1:50) con solución salina amortiguada fosfatada (PBS) para la determinación de la concentración de estradiol mediante radioinmunoanálisis en fase sólida.<sup>23</sup>

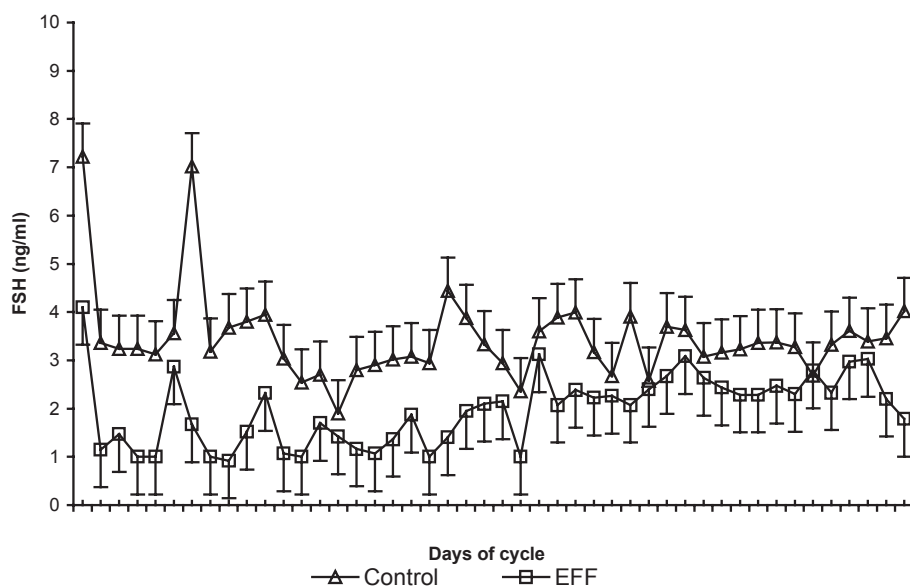
Cuando las concentraciones de progesterona superaron 1 ng/ml se inició la fase lútea, que terminó al reducirse a menos de 1 ng/ml.<sup>1</sup> Se calcularon las pulsaciones de PGF2 $\alpha$  y el intervalo entre ellas, según el método de Zarco *et al.*<sup>24</sup>

Las concentraciones de progesterona y FSH se compararon mediante análisis de varianza para mediciones repetidas. La duración de la fase lútea, la concentración de estradiol folicular y el tamaño folicular se compararon entre grupos mediante una prueba "t" de Student.

\*Chronogest, Intervet, México.

\*\*Lutalyse, Upjohn, México.





**Figura 1.** Concentraciones de FSH de ovejas en diestro tratadas con 3ml de LFE cada 8 h y testigos. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar;  $P < 0.05$ . FSH concentrations during diestrus of ewes treated with 3 ml of EFF every 8h and control animals. Values are presented as mean  $\pm$  standard error;  $P < 0.05$

of the control group ( $3.42 \pm 0.20$  mm;  $34.8 \pm 12.15$  ng/ml).

### **Progesterone concentrations and luteal phase length**

Both the luteal phase and the oestrous cycle were longer ( $P < 0.05$ ) in the treated group ( $13.5 \pm 0.53$  and  $19.5 \pm 0.66$  days) than in the control one ( $12.2 \pm 0.32$  and  $17.7 \pm 0.26$  days). During the treatment period progesterone concentrations tended to be higher in the EFF group than in the control group, from day 13 onwards; nevertheless, this difference was only significant ( $P < 0.05$ ) on day 15 of the cycle (Table 1).

A pulsatile secretion pattern of the metabolite of the PGF $2\alpha$  was observed in the 4 ewes in which this metabolite was determined. Five pulses of PGF $2\alpha$  were present in each of the ewes from the control group (ewes 67 and 56) between days 15 and 17 of the cycle, with an interval between pulses of  $8 \pm 3.2$  h (Figures 2 and 3); this pulsatile release was associated with CL regression. One of the ewes treated with EFF (No. 57) showed 5 pulses between days 14 and 17, with an interval between pulses of  $14 \pm 2.3$  h (Figure 4). The other ewe treated with EFF (No. 1231) showed four pulses between days 14-20, with an interval between them of  $22 \pm 12$  h (Figure 5). Afterwards, in both ewes, the secretion of PGF $2\alpha$  was accelerated, coincidentally with CL regression in ewe No. 1231 on day 21 of the cycle and on day 18 in ewe No. 57.

### **Discussion**

The treatment with EFF caused a significant reduction

## **Resultados**

### **Concentraciones de FSH, estradiol y desarrollo folicular**

Las concentraciones de FSH entre los días 12 a 16 fueron significativamente menores ( $P < 0.05$ ) en las ovejas tratadas con LFE que en las testigo (Figura 1). Tanto el diámetro promedio de los folículos ováricos como la concentración de estradiol en el líquido folicular fueron significativamente menores ( $P < 0.05$ ) en las ovejas del grupo tratado ( $2.62 \pm 0.14$  mm;  $4.35 \pm 2.3$  ng/ml) que en las del testigo ( $3.42 \pm 0.20$  mm;  $34.8 \pm 12.15$  ng/ml; media  $\pm$  error estándar).

### **Concentraciones de progesterona y longitud de la fase lútea**

La fase lútea y el ciclo estral fueron más largos ( $P < 0.05$ ) en las ovejas del grupo tratado ( $13.5 \pm 0.53$  y  $19.5 \pm 0.66$  días) que en las del grupo testigo ( $12.2 \pm 0.32$  y  $17.7 \pm 0.26$  días). Al comparar las concentraciones de progesterona entre los dos grupos durante el periodo de tratamiento, se observó que las ovejas que recibieron LFE tuvieron niveles numéricamente más elevados que las testigo a partir del día 13; esta diferencia sólo fue significativa ( $P < 0.05$ ) el día 15 del ciclo (Cuadro 1).

En las cuatro ovejas en las que se determinaron las concentraciones del metabolito de la PGF $2\alpha$  se observó un patrón de secreción pulsátil. En las ovejas del grupo testigo (ovejas 67 y 56) se presentaron cinco pulsos de PGF $2\alpha$  durante los días 15 y 17 del ciclo, con intervalo entre pulsos de  $8 \pm 3.2$  h (Figuras 2 y 3), lo que se asoció con la regresión del cuerpo lúteo. Una oveja tratada con LFE (número 57) pre-

**Cuadro 1**

CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA PLASMÁTICA (NG/ML) DE OVEJAS TRATADAS CON LÍQUIDO FOLICULAR EQUINO LIBRE DE HORMONAS ESTEROIDES Y TESTIGOS, QUE RECIBIERON EL TRATAMIENTO A PARTIR DEL DÍA 11 DEL CICLO

PLASMATIC PROGESTERONE CONCENTRATIONS (NG/ML) OF TREATED EWES WITH EQUINE FOLLICULAR FLUID FREE OF STEROID HORMONES AND CONTROL ANIMALS. THE TREATMENT STARTED ON DAY 11 OF THE CYCLE.

<i>Days of the cycle</i>	<i>GROUPS</i>	
	<i>Treated (n=16)</i>	<i>Control (n=10)</i>
	<i>Mean ± SE</i>	<i>Mean ± SE</i>
4	1.27 ± 0.18	1.12 ± 0.23
7	2.33 ± 0.18	2.18 ± 0.23
11	2.67 ± 0.18	3.25 ± 0.23
12	2.62 ± 0.18	2.76 ± 0.23
13	3.53 ± 0.18	2.94 ± 0.23
14	3.49 ± 0.18	3.04 ± 0.23
* 15	2.62 ± 0.18	1.88 ± 0.23
16	1.78 ± 0.18	1.24 ± 0.23
17	1.03 ± 0.18	0.40 ± 0.23
18	0.68 ± 0.18	0.26 ± 0.23

No statistical differences were found between groups except on day 15 of the oestrus cycle.

in FSH concentrations (Figure 1) that was associated with a reduction in follicle development; confirming observations of previous studies using equine follicular fluid<sup>18</sup> as well as bovine follicular fluid (BFF).<sup>11,15,25</sup> Likewise, the treatment with EFF produced a significant reduction in estradiol concentrations in the follicular fluid, which agrees with reports from McLeod and McNeilly<sup>14</sup> and Beard and Hunter<sup>10</sup> in which bovine follicular fluid was used as an inhibin source.

Ewes treated with EFF had a longer luteal phase than those in the control group which indicates that the suppression of follicular development through EFF treatment indeed delays luteolysis. These results coincide with those of Miquelajaurgui,<sup>26</sup> who obtained the same effect using follicular fluid of bovine origin. Furthermore, premature CL regression has been avoided through the administration of BFF<sup>10</sup> or EFF<sup>27</sup> to ewes induced to cycle during anestrus. Beard and Hunter<sup>10</sup> proposed that this effect is due to the suppression of circulating estradiol concentrations, which is supported by other studies in which ovarian follicles of ewes were physically removed,<sup>7,8</sup> and in those undertaken in cows in which their follicles were removed or their development suppressed.<sup>9,28</sup>

The results of the present study suggest that the mechanism by which the reduction in estradiol concentrations lengthens the luteal phase is through the

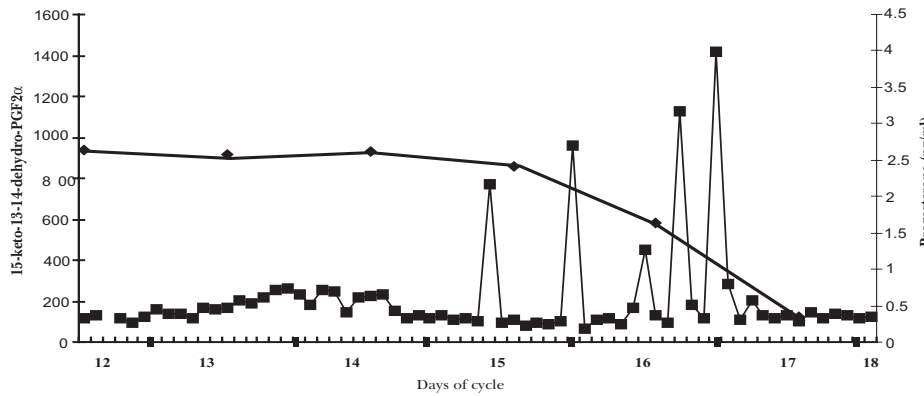
sentó cinco pulsos con un intervalo entre pulsos de  $14 \pm 2.3$  h entre los días 14 y 17 (Figura 4); mientras que la otra oveja tratada con LFE (número 1 231) tuvo cuatro pulsos entre los días 14-20, con intervalo entre ellos de  $22 \pm 12$  h (Figura 5). Posteriormente en ambas ovejas se aceleró la secreción de PGF<sub>2</sub>α, lo que coincidió con la regresión del cuerpo lúteo el día 21 del ciclo en la oveja número 1 231 y el día 18 en la oveja número 57.

## Discusión

El tratamiento con LFE provocó disminución significativa de las concentraciones de FSH (Figura 1) y reducción en el desarrollo folicular, similar a lo observado en estudios previos utilizando tanto líquido folicular equino<sup>18</sup> como líquido folicular bovino (LFB).<sup>11,15,25</sup> El tratamiento con LFE resultó en reducción significativa en las concentraciones de estradiol en el líquido folicular, similar a lo observado por McLeod y McNeilly<sup>14</sup> y Beard y Hunter,<sup>10</sup> quienes utilizaron líquido folicular bovino como fuente de inhibina.

Las ovejas tratadas con LFE tuvieron una fase lútea de mayor duración que las ovejas testigo, ello indica que la supresión del desarrollo folicular mediante el tratamiento con LFE permite retrasar la luteolisis. Estos resultados coinciden con lo observado por Miquelajaurgui,<sup>26</sup> quien utilizó líquido

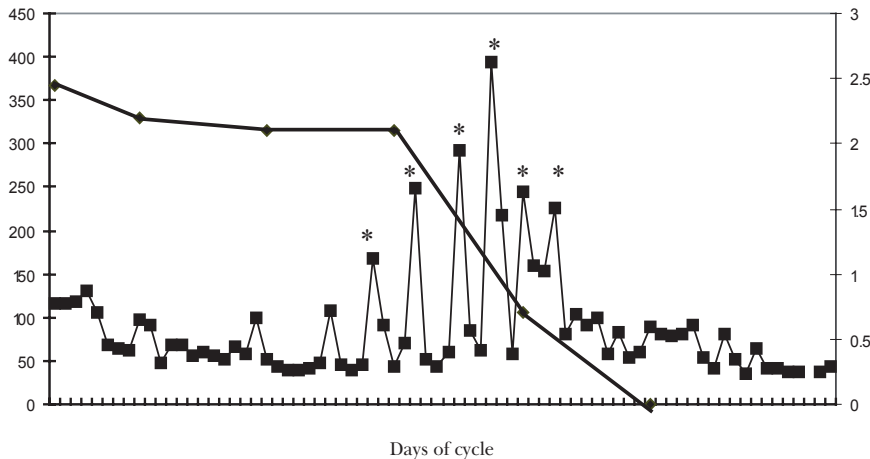
Ewe 67



**Figure 2.** Concentraciones de progesterona y 15-ceto-13-14-dihidro-PGF2 $\alpha$  de una oveja testigo. Los valores señalados con asterisco indican la presentación de pulsos significativos del metabolito de la PGF2 $\alpha$ .

Progesterone ( $\blacklozenge$ ) and 15-keto-13-14-dehydro-PGF2 $\alpha$  ( $\blacksquare$ ) concentrations in a control ewe. Values marked with asterisk show significant pulses of the PGF2 $\alpha$  metabolite.

Ewe 56



**Figure 3.** Concentraciones de progesterona y 15-ceto-13-14-dihidro-PGF2 $\alpha$  de una oveja testigo. Los valores señalados con asterisco indican la presentación de pulsos significativos del metabolito de la PGF2 $\alpha$ .

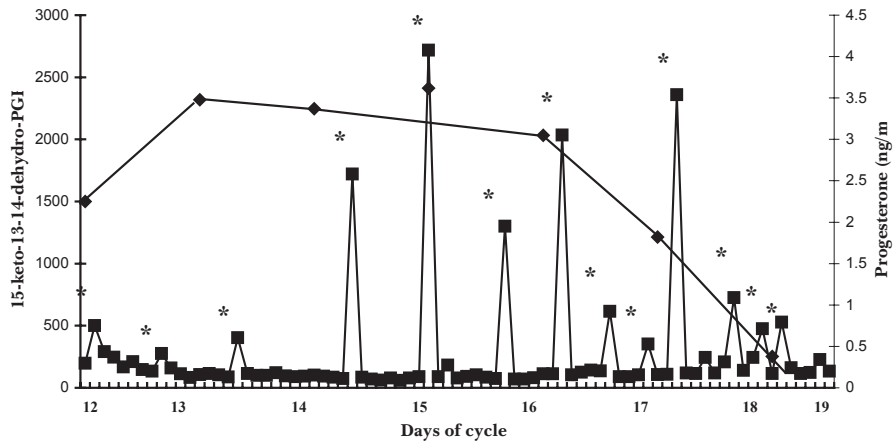
Progesterone ( $\blacklozenge$ ) and 15-keto-13-14-dehydro-PGF2 $\alpha$  ( $\blacksquare$ ) concentrations in a control ewe. Values marked with asterisk show significant pulses of the PGF2 $\alpha$  metabolite.

interference with the establishment of the pulsatile pattern of PGF2 $\alpha$  secretion that is required to cause luteolysis<sup>1</sup> Thus, one ewe (No. 57) treated with EFF presented 5 pulses between days 14 to 17 at  $14 \pm 2.3$  h, intervals, whereas the other EFF ewe (No. 1231) had 4 pulses from day 14 to 20 at  $22 \pm 12$  h, intervals. Corpus luteum regression in the ewes treated with EFF only took place when the frequency of PGF2 $\alpha$  secretion was increased. In contrast, the ewes in the control group presented 5 PGF2 $\alpha$  pulses between days 15 and 17 of the cycle, with an interval between pulses of  $8 \pm 3.2$  h, which was associated with luteolysis. These observations coincide with those of Zarco *et al.*<sup>1</sup> who noticed that, in order for luteolysis to take place, it is necessary that pulses

folicular de origen bovino para provocar el mismo efecto. Además, previamente se ha logrado evitar la regresión prematura del cuerpo lúteo mediante la administración de LFB<sup>10</sup> o LFE<sup>27</sup> en ovejas inducidas a ciclar durante la época de anestro. Beard y Hunter<sup>10</sup> propusieron que este efecto se debe a la supresión de las concentraciones circulantes de estradiol, esto es apoyado por los trabajos en los que se eliminan físicamente los folículos ováricos en ovejas,<sup>7,8</sup> y con los efectuados con vacas en las que se eliminan los folículos o se suprime su desarrollo.<sup>9,28</sup>

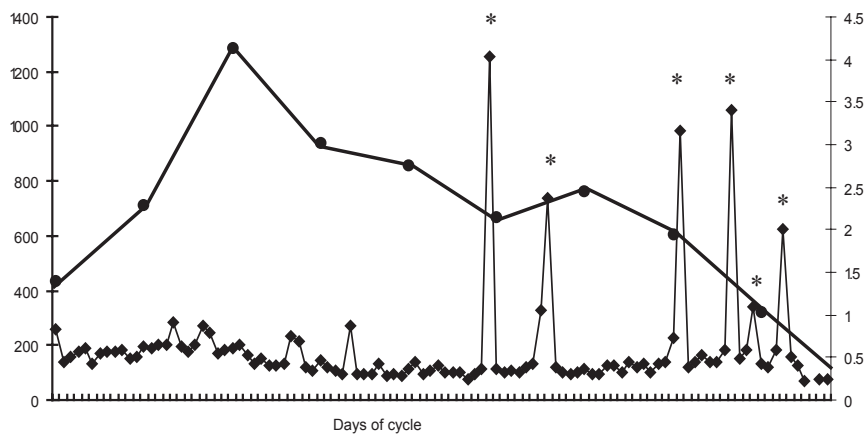
Los resultados de este estudio sugieren que el mecanismo mediante el cual la reducción en las concentraciones de estradiol favorece la prolongación de la fase lútea se efectúa a través de la interferencia con

### Ewe 57



**Figure 4.** Concentraciones de progesterona y 15-ceto-13-14-dihidro-PGF2 $\alpha$  de una oveja tratada con 3 ml de LFE cada 8 h durante el diestro tardío. Los valores señalados con asterisco indican la presentación de pulsos significativos del metabolito de la PGF2 $\alpha$ .

Concentrations of progesterone ( $\blacklozenge$ ) and 15-keto-13-14-dehydro-PGF2 $\alpha$  ( $\blacksquare$ ) in an ewe treated with 3 ml of EFF every 8h during late diestrus. Values marked with asterisk show significant pulses of the PGF2 $\alpha$  metabolite.



**Figure 5.** Concentraciones de progesterona y 15-ceto-13-14-dihidro-PGF2 $\alpha$  de una oveja tratada con 3 ml de LFE cada 8 h durante el diestro tardío. Los valores señalados con asterisco indican la presentación de pulsos significativos del metabolito de la PGF2 $\alpha$ .

Concentrations of progesterone ( $\blacklozenge$ ) and 15-keto-13-14-dehydro-PGF2 $\alpha$  ( $\blacksquare$ ) in an ewe treated with 3 ml of EFF every 8h during late diestrus. Values marked with asterisk show significant pulses of the PGF2 $\alpha$  metabolite.

occur with a frequency of one pulse every 8 h. The same group also observed that a reduction in the frequency of PGF2 $\alpha$  is associated with the luteolytic failure of ewes with spontaneous persistence of the CL, in which the average interpulse interval was about 16 h.<sup>24</sup> The results of the present study suggest that the delay of CL regression caused by follicular suppression is related to a failure in the establishment of a luteolytic pattern of PGF2 $\alpha$  secretion and not to the total suppression of PGF2 $\alpha$  production.

The modification of the pulse frequency observed in this study is similar to the one found by Zhang *et al.*,<sup>29</sup> who suppressed estradiol concentrations by irradiating ovarian follicles and observed that the PGF2 $\alpha$  secretion was not avoided but the interval between pulses was lengthened, thus delaying CL regression. They suggested that the role of estradiol in the syn-

el patrón de secreción pulsátil requerido para que la luteólisis se realice.<sup>1</sup> Así, en una oveja tratada con LFE (número 57) se presentaron cinco pulsos entre los días 14 y 17 con un intervalo de  $14 \pm 2.3$  h, mientras que la otra oveja tratada con LFE (número 1 231) tuvo cuatro pulsos entre los días 14-20, con intervalo de  $22 \pm 12$  h. La regresión del cuerpo lúteo en las ovejas tratadas con LFE sólo ocurrió cuando la frecuencia de secreción de PGF2 $\alpha$  se incrementó. Estos resultados contrastan con lo observado en las ovejas del grupo testigo, que presentaron cinco pulsos durante los días 15 y 17 del ciclo, con intervalo entre pulsos de  $8 \pm 3.2$  h, lo que se asoció con la ocurrencia de la luteólisis. Estas observaciones coinciden con lo encontrado por Zarco *et al.*,<sup>1</sup> quienes observaron que para que se efectúe la luteólisis se necesita que los pulsos ocurran con frecuencia de un pulso cada



thesis of oxytocin receptors for the establishment of the PGF2 $\alpha$  pulsatile secretion could be to facilitate the recycling of oxytocin receptors, rather than to be an absolute requirement for their synthesis<sup>29</sup>.

In the present study, although luteal regression was prolonged in the treated ewes, the average delay in luteolysis was only slightly longer than 1 day, after which CL regression took place. The same happened when Miquelajauregui<sup>26</sup> used bovine follicular fluid during diestrus. This aspect is particularly interesting, as the same EFF treatment in ewes with short luteal phases avoids premature regression<sup>27</sup>, lengthening the luteal phase 7 or 8 days more than in the non-treated ewes. This difference between the treatment during the diestrus of normal cycles and that during short cycles can be due to the length of progesterone exposure, since after 10 to 12 days of exposure to this hormone the uterus starts producing PGF2 $\alpha$  even in ovariectomized ewes,<sup>30</sup> i.e., without being exposed to estradiol. Then, it is possible that in spite of the achieved estradiol suppression with the EFF treatment, the length of exposure to progesterone finally determined the establishment of the pulsatile secretion of PGF2 $\alpha$  which was evident on days 14-15 when ewes treated with EFF and the control ones started to produce PGF2 $\alpha$  pulses. Also in the study of Balcazar<sup>27</sup> regression of the corpus luteum occurred on days 14 or 15 of the cycle, even when the animals were still receiving EFF in that moment.

It is concluded that the treatment with EFF reduced FSH secretion, which resulted in the presence of smaller ovarian follicles with lower estradiol concentrations, lengthening the luteal phase probably due to a modification in the pattern of PGF2 $\alpha$  secretion.

## Referencias

1. Zarco L, Stabenfeldt GH, Quirke JF, Kindahl H, Bradford GE. Release of prostaglandin F-2 and the timing of events associated with luteolysis in ewes with oestrous cycles of different lengths. *J Reprod Fertil* 1988;83:517-526.
2. McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 1999;79:263-324.
3. Hunter MG. Characteristics and causes of the inadequate *corpus luteum*. *J Reprod Fertil* 1991; 43 (Suppl):91-99.
4. Hernández CJ, Valencia MJ, Zarco L. Regresión prematura del cuerpo lúteo en la oveja. *Agrociencia* 1997;31:457-463.
5. Odensvik K, Gustafsson H. Effect of flunixin during asynchronous embryo transfer in the heifer. *Anim Reprod Sci* 1994;36:13-24.
6. Mann GE, Lamming GE. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 2001;121:175-180.

8 h. En contraste, una disminución en la frecuencia de secreción de PGF2 $\alpha$  provoca falla en la luteolisis, como sucede en las ovejas que presentan persistencia espontánea del cuerpo lúteo, en las que se observó un pulso cada 16 h.<sup>24</sup> Los resultados del presente trabajo sugieren que el retraso de la regresión del cuerpo lúteo cuando se eliminan los folículos ováricos obedecería más que a un retraso en la secreción de PGF2 $\alpha$ , a una falla en el establecimiento de un patrón luteolítico de secreción de esta hormona.

La modificación de la frecuencia de los pulsos observada en este trabajo es similar a la encontrada por Zhang *et al.*,<sup>29</sup> quienes suprimieron las concentraciones de estradiol mediante irradiación de los folículos ováricos y vieron que la secreción de PGF2 $\alpha$  no se evitaba, pero el intervalo entre pulsos se alargaba, retrasando de esta forma la regresión del cuerpo lúteo. Lo anterior confirma que el papel del estradiol en la síntesis de receptores a oxitocina durante el establecimiento de la secreción pulsátil de PGF2 $\alpha$  puede ser un papel facilitador del reciclaje de receptores de oxitocina más que un requerimiento absoluto para su síntesis.<sup>29</sup>

No obstante que en el presente trabajo las ovejas tratadas tuvieron una fase lútea más larga, esta prolongación fue apenas de un poco más de un día, en promedio. Algo similar ocurrió cuando Miquelajauregui<sup>26</sup> utilizó LFB durante el diestro. Esta situación resulta interesante, ya que el mismo tratamiento en ovejas con fases lúteas cortas evita la regresión prematura<sup>27</sup> y prolonga la fase lútea durante siete u ocho días más que en las ovejas no tratadas. Esta diferencia puede obedecer al tiempo de exposición a progesterona, ya que después de diez a 12 días de exposición a esta hormona, el útero comienza a secretar PGF2 $\alpha$  aun en ovejas ovariectomizadas;<sup>30</sup> es decir, sin necesidad de ser expuesto a estradiol. Entonces, es posible que a pesar de la supresión de la concentración de estradiol lograda con el tratamiento con LFE, la duración de la exposición a progesterona haya determinado el establecimiento de la secreción pulsátil de PGF2 $\alpha$ , ya que fue evidente que en los días 14-15 del ciclo tanto las ovejas tratadas con LFE como las testigo comenzaron a liberar pulsos de PGF2 $\alpha$ . También en el trabajo de Balcazar<sup>27</sup> la regresión del cuerpo lúteo ocurrió los días 14 o 15 del ciclo, a pesar de que los animales continuaban recibiendo LFE en ese momento.

Se concluye que el tratamiento con LFE redujo la secreción de FSH, lo que explica la presencia de folículos ováricos de menor tamaño, con menores concentraciones de estradiol y con alargamiento de la fase lútea, posiblemente debido a una modificación del patrón de secreción de la PGF2 $\alpha$ .

7. Karsch FJ, Noveroske JW, Roche JF, Norton HW, Nalbandov AV. Maintenance of ovine *corpora lutea* in the absence of ovarian follicles. *Endocrinology* 1970;87:1228-1230.
8. Ginther OJ. Response of corpora lutea to

- cauterization of follicles in sheep. *Am J Vet Res* 1971;32:59-62.
9. Villa-Godoy A, Ireland JJ, Wortman JA, Ames NK, Hughes TL, Fogwell RL. Effect of ovarian follicles on luteal regression in heifers. *J Anim Sci* 1985;60:519-527.
  10. Beard AP, Hunter MG. Effects of bovine follicular fluid and exogenous oestradiol on the GnRH-induced short luteal phase in anoestrous ewes. *J Reprod Fertil* 1994;100:211-217.
  11. McNeilly AS. Changes in FSH and the pulsatile secretion of LH during the delay in oestrus induced by treatment of ewes with bovine follicular fluid. *J Reprod Fertil* 1984;72:165-172.
  12. Baird DT, Campbell BK, Mann GE, McNeilly AS. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J Reprod Fertil* 1991; 43 (Suppl):125-138.
  13. Wallace JM, McNeilly AS. Changes in FSH and the pulsatile secretion of LH during treatment of ewes with bovine follicular fluid throughout the luteal phase of the oestrous cycle. *J Endocrinol* 1986;111:317-327.
  14. McLeod BJ, McNeilly AS. Suppression of plasma FSH concentrations with bovine follicular fluid blocks ovulation in GnRH-treated seasonally anoestrous ewes. *J Reprod Fertil* 1987;81:187-194.
  15. Hunter MG, Hindle JE, McLeod BJ, McNeilly AS. Treatment with bovine follicular fluid suppresses follicular development in gonadotrophin-releasing hormone-treated anoestrous ewes. *J Endocrinol* 1988;119:95-100.
  16. Roser JF, McCue PM, Hoye E. Inhibin activity in the mare and stallion. *Domest Anim Endocrinol* 1994;11:87-100.
  17. Bergfelt DR, Ginther OJ. Delayed follicular development and ovulation following inhibition of FSH with equine follicular fluid in the mare. *Theriogenology* 1985;24:99-108.
  18. Hernández CJ, Murcia MC, Valencia MJ, Rojas MS, Zárate MJ, Zarco L. Efecto del líquido folicular equino libre de esteroides sobre la secreción de FSH en ovejas en anestro estacional y la presentación del estro inducido con PGF<sub>2α</sub> en ovejas ciclando. *Vet Méx* 1997;28:117-121.
  19. García de DE. Modificaciones al sistema de clasificación climatológica de Köppen. 4a ed. México (DF): Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, 1987.
  20. Quispe T, Zarco L, Valencia J, Ortiz A. Estrus synchronization with melengestrol acetate in cyclic ewes. Insemination with fresh or frozen semen during the first or second estrus post treatment. *Theriogenology* 1994;41:1385-1392.
  21. Pulido A, Zarco L, Galina CS, Murcia C, Flores G, Posadas E. Progesterone metabolism during storage of blood samples from Gyr cattle: effects of anticoagulant, time and temperature of incubation. *Theriogenology* 1991;35:965-975.
  22. Granström E, Kindahl H. Radioimmunoassay of the major plasma metabolite of PGF-2<sub>α</sub>, 15-keto-13,14-dihydro-PGF-2. *Methods Enzymol* 1982;86:320-329.
  23. Turzillo AM, Fortune JE. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. *J Reprod Fertil* 1990;89:643-653.
  24. Zarco L, Stabenfeldt GH, Kindahl H, Quirke JF, Granström E. Persistence of luteal activity in the non-pregnant ewe. *Anim Reprod Sci* 1984;7:245-267.
  25. Miller KF, Critser JK, Rowe RF, Ginther OJ. Ovarian effects of bovine follicular fluid treatment in sheep and cattle. *Biol Reprod* 1979;21:537-544.
  26. Miquelajauregui GME. Efecto de la inhibina o flunixin-meglumine (finadyne) sobre la luteólisis en ovejas (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1993
  27. Balcázar SA. Efecto de la administración de líquido folicular equino libre de esteroides sobre el desarrollo folicular, duración de la fase lútea y fertilidad de ovejas inducidas a ovular mediante la administración de hCG (tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1995.
  28. Salfen BE, Cresswell JR, Xu ZZ, Bao B, Garverick HA. Effects of the presence of a dominant follicle and exogenous oestradiol on the duration of the luteal phase of the bovine estrous cycle. *J Reprod Fertil* 1999;115:15-21.
  29. Zhang J, Weston PG, Hixon JE. Influence of estradiol on the secretion of oxytocin and prostaglandin F<sub>2</sub> during luteolysis in the ewe. *Biol Reprod* 1991;45:395-403.
  30. Beard AP, Lamming GE. Oestradiol concentration and the development of the uterine oxytocin receptor and oxytocin-induced PGF<sub>2α</sub> release in ewes. *J Reprod Fertil* 1994;100:469-475.