

Inyección de prostaglandina F₂ alfa (PGF_{2α}) en el folículo preovulatorio de la yegua

Agustina Grippo^{1*}, Javier Aguilar¹, Juan Cuervo-Arango², Rebeca Martínez-Boví³, Catalina Castañeira¹, Carolina Alonso¹, Horacio Mouguelar⁴, Ana Paula Flores Bragulat¹, Luis Losinno¹.

1- Laboratorio de Producción Equina, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

2- Department of Equine Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.

3- Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera, CEU Universities, Alfara del Patriarca, España.

4- Departamento de Anatomía Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.

Palabras clave

Yegua
prostaglandinas
ovulación
folículo hemorrágico anovulatorio

Resumen. Las prostaglandinas (PGE₂ y PGF_{2α}) ejercen un rol esencial en el proceso de la ovulación en los mamíferos. El objetivo de este experimento fue determinar si la inyección intrafolicular con prostaglandina F₂ alfa (PGF_{2α}) administrada en el período preovulatorio inducía la ovulación normal y formación del cuerpo lúteo, confirmado más tarde con la presencia de una vesícula embrionaria. Se utilizaron 6 yeguas mestizas en dos ciclos estrales cada una, con un diseño crossover. El tracto reproductivo de las yeguas fue ecografiado cada 24 h desde el día 15 del ciclo (Día 0 = día de la ovulación) hasta el momento de la punción folicular (Hora 0). La punción ecoguiada del folículo preovulatorio (diámetro ≥ 35mm y presencia de moderado edema uterino) se realizó a través del flanco, inyectando 750 µg de PGF_{2α} diluido en 0,5 ml de agua estéril (grupo tratado n=6) o placebo (0,5 ml de agua de inyección) (grupo control n=6). Previo a la punción, las yeguas fueron inseminadas con semen fresco. Se obtuvieron imágenes ultrasonográficas cada 12 h del folículo punzado y se tomaron muestras de sangre cada 48 h de la vena yugular para determinar los niveles plasmáticos de progesterona. Cinco de las seis yeguas (83%) del grupo tratado, tuvieron fallas en la ovulación y sólo una de las yeguas ovuló pero no se obtuvo preñez. De acuerdo con estos resultados, la inyección intrafolicular con PGF_{2α} no permitiría la ovulación normal y, contrariamente a lo esperado, induciría la formación de folículos hemorrágicos anovulatorios. Además, se observó un retraso en la elevación de progesterona en la única yegua que ovuló.

Citar como: Grippo, A., Aguilar, J., Cuervo-Arango, J., Martínez-Boví, R., Castañeira, C., Alonso, C., Mouguelar, H.,... Losinno, L. (2020) Inyección de prostaglandina F₂ alfa (PGF_{2α}) en el folículo preovulatorio de la yegua. *Revista Científica FAV-UNRC Ab Intus* 5(3) 08-18

Recibido: 25/11/2019 Aceptado: 25/3/2020

***Autora para correspondencia:** Agustina Grippo, E-mail: agustinagrippo@gmail.com, Ruta Nacional 36, Km. 601, 5800 Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Tel.: +54 9 358 5625198.

Financiamiento: PPI 2015, Facultad de Agronomía y Veterinaria., UNRC.

Injection of prostaglandin F₂ alpha (PGF_{2α}) into the mare's preovulatory follicle

Keywords

Mare
prostaglandins
ovulation
anovulatory hemorrhagic follicles

Abstract: Prostaglandins (PGE₂ and PGF_{2α}) play an essential role in the ovulation process in mammals. The objective of this experiment was to determine whether intrafollicular injection with prostaglandin F₂ alpha (PGF_{2α}) administered in the pre-ovulation period induced normal ovulation and corpus luteum formation, it was later confirmed with the presence of an embryonic vesicle. Six mixed-breed mares were used in two estrous cycles each, with a crossover design. The ultrasonographic examination of the reproductive tract was performed every 24 hours from day 15 of the cycle (Day 0 = day of ovulation) until the time of follicular puncture (Hour 0). The ultrasound guided puncture of the preovulatory follicle (diameter ≥ 35 mm and presence of moderate uterine edema) was performed through the flank, injecting 750 µg of PGF_{2α} diluted in 0.5 ml of sterile water (treated group n = 6) or placebo (0.5 ml of injection water) (control group n = 6). Prior to puncture, the mares were inseminated with fresh semen. Ultrasound images were obtained every 12 h of the punctured follicle and blood samples were taken every 48 h from the jugular vein to determine plasma progesterone levels. Five of the six mares (83%) of the treated group had ovulation failures and only one of the mares ovulated but no pregnancy was obtained. According to these results, intrafollicular injection with PGF_{2α} at the concentration used would not allow normal ovulation and contrary to expectations would induce the formation of anovulatory hemorrhagic follicles. In addition, a delay in progesterone rise was observed in the only mare that ovulated.

INTRODUCCIÓN

La ovulación es un proceso esencial para los animales con reproducción sexual. Se produce, dentro de un complejo fenómeno bioquímico-molecular, por el aumento de la hormona Luteinizante (LH) circulante y conduce, desde el ovario, a la expulsión del ovocito en condiciones de ser fertilizado. En la literatura, se han descrito vías celulares y moleculares que controlan la ovulación, como así también los mecanismos reguladores que intervienen dentro del folículo preovulatorio y su posterior ovulación, en donde los équidos son únicos en algunos aspectos de la función ovárica (Gérard y Robin, 2019).

La liberación de un ovocito capaz de ser fertilizado es una función crítica del ovario y es necesaria para el éxito reproductivo. El folículo que ovula ha adquirido funciones específicas que le permiten responder al aumento preovulatorio de la LH. Una característica específica del folículo preovulatorio es la

presencia de receptores de LH en células de la granulosa. La unión de los mismos a la hormona controla los eventos moleculares y celulares que culminan en la ovulación (Richards, 2018). Aunque la ovulación a menudo se conoce como "ruptura" del folículo preovulatorio, la liberación del ovocito, rodeado de células del cúmulo, es un proceso de extrusión y ocurre, en parte, por la degradación de la pared del folículo y contracción del mismo en un proceso denominado evacuación folicular (Adams *et al.*, 2016).

En la yegua, las concentraciones de LH aumentan lentamente (comenzado en el estro temprano, justo después del final de la luteólisis) y luego aumenta rápidamente, aproximadamente 2 días antes de la ovulación. Finalmente, el pico de LH alcanza su máxima concentración un día después de la ovulación (Ginther *et al.*, 2008). El aumento de LH estimula una cascada de señalización la cual desencadena cambios en la expresión génica en subpoblaciones celulares del ovario que son críticos para la ovu-

lación y la luteinización (Couse *et al.*, 2005). Esto provoca una importante remodelación del folículo preovulatorio que incluye la reprogramación de las células de la granulosa para diferenciarse en células luteales, cambios en las propiedades secretoras de células del cúmulo y la maduración del ovocito (Conti *et al.*, 2006). Se ha demostrado que muchos de los genes que son inducidos en el folículo, como respuesta al aumento de la LH, son críticos para la ovulación en ratones. Estos incluyen el receptor de Progesterona (PGR) (Kim *et al.*, 2009), Prostaglandina-Endoperóxido Sintasa 2 (PTGS2) (Lim *et al.*, 1997) y el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) (Hsieh *et al.*, 2006).

En particular, las prostaglandinas son importantes mediadores del proceso ovulatorio (Murdoch *et al.*, 1993) y su rol esencial en este proceso se ha descrito en varias especies mamíferas incluyendo la mujer. Ha sido demostrado claramente que si una hembra en su fase estral recibe altas dosis de drogas antiinflamatorias (meclumina de flunixin, indometacina, piroxicam, celecoxib) el resultado es un bloqueo o falla en la ovulación. Este tipo de estudio ha sido realizado en yeguas (Cuervo-Arango y Domingo-Ortiz, 2011), vacas (Li *et al.*, 2006), cabras (Perez *et al.*, 2011), ratas (Sogn *et al.*, 1987) y mujeres (Edelman *et al.*, 2013), todos ellos con resultados similares, lo cual refuerza la idea que los inhibidores de la síntesis de prostaglandinas pueden bloquear la ovulación. Sin embargo, un estudio reciente demostró que el uso de fenilbutazona, una droga antiinflamatoria no esteroidea (AINE's), en dosis terapéuticas, no interrumpió el proceso de la ovulación en las yeguas, pero retrasó la ovulación en más de 15 h, lo cual podría perjudicar las tasas de preñez en inseminaciones a tiempo fijo (Larentis *et al.*, 2018).

En la yegua, la falla ovulatoria patológica más común que ocurre espontáneamente durante la temporada reproductiva es el folículo hemorrágico anovulatorio (HAF, del inglés Haemorrhagic Anovulatory Follicle) (Ginther *et al.*, 2007; Cuervo-Arango y Newcombe, 2010; Aguilar *et al.*, 2015). Un estudio demostró que la inyección intrafolicular de prostaglandina E_2 (PGE_2) y de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), por punción ecoguiada transvaginal, revirtió los efectos anovulatorios de yeguas tratadas en el periodo preovulatorio con meclumina de flunixin, las cuales habían

evidenciado la formación de HAF's (Martínez-Boví y Cuervo-Arango, 2016b). Esto refuerza aún más el rol fundamental que tienen las prostaglandinas en el proceso de la ovulación. Otro estudio reciente, evidenció que la punción intrafolicular con PGE_2 y de $PGF_{2\alpha}$ través del flanco (Aguilar *et al.*, 2018) producía la ovulación normal en la yegua y de igual manera podría ser utilizada como una opción terapéutica ante fallas en la ovulación en la yegua.

El papel exacto de las prostaglandinas durante el proceso ovulatorio de los mamíferos no está dilucidado completamente, pero se cree que activan varias familias de metaloproteinasas de matriz y activador de plasminógeno que producen una remodelación tisular extensa en el ápex del folículo y que culmina en la ruptura de la pared folicular y en consecuencia se produce la ovulación (Robker *et al.*, 2000).

Una enzima clave que limita la velocidad de producción de las prostaglandinas intrafoliculares, es la prostaglandina G/H sintasa-2 (PGHS-2) (Sirois y Doré, 1997). En las yeguas, la PGHS-2 se expresa en las células de la granulosa 30 h después del comienzo de la onda preovulatoria de LH endógena o a partir del tratamiento con gonadotropina coriónica humana (hCG), una hormona que induce un aumento brusco de la concentración de LH (Ginther *et al.*, 2009) y, en consecuencia, la concentración de PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$ en el líquido folicular aumenta gradualmente entre 30 y 39 h después de la administración de hCG (Sirois y Doré, 1997).

El objetivo del presente estudio fue determinar si la administración intrafolicular de $PGF_{2\alpha}$ en las yeguas, a través del flanco, con un diámetro folicular cercano a 35mm y moderado edema uterino, induciría la ovulación normal y la subsecuente formación de un cuerpo lúteo funcional, corroborado a su vez con la detección ecográfica de una vesícula embrionaria a los 15 días post-ovulación. A su vez, se probará si la inyección intrafolicular de $PGF_{2\alpha}$ a altas dosis tiene un efecto similar a aquella utilizada en combinación con PGE_2 tal como se ha demostrado en un estudio realizado por Martínez-Boví y Cuervo-Arango (2016a).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y examen ultrasonográfico

Este estudio fue realizado en el Laboratorio de Producción Equina de la Universidad Nacional de Río Cuarto durante la temporada reproductiva (primavera-verano) de 2018/19. Para ello, se utilizaron seis yeguas mestizas entre 3 y 12 años de edad, cuyo peso fue entre 400 y 550 kg. Las mismas se encontraban en el mismo potrero y eran alimentadas con pastura de leguminosas y gramíneas, y contaban con agua fresca *ad libitum*. Las yeguas fueron asignadas al azar, en un diseño experimental crossover, a un grupo control (punción intrafolicular de agua de inyección estéril) y un grupo tratado (punción intrafolicular de PGF_{2α}). El tracto reproductivo fue examinado transrectalmente usando un ecógrafo Modo-B con transductor lineal de 5-MHz (Sonoscape A6). Todas las yeguas habían tenido al menos un ciclo estral ovulatorio verificado antes del inicio del estudio, confirmado ecográficamente por la presencia de un cuerpo lúteo. El examen ultrasonográfico fue realizado cada 24 h desde el día 15 del ciclo (Día 0 = día de la ovulación) hasta el momento de la punción (Hora 0). La ovulación fue detectada cuando el folículo preovulatorio había desaparecido con al menos la evacuación de $\geq 90\%$ del líquido folicular (Townson y Ginther, 1987) y con la consecuente presencia de un cuerpo hemorrágico (CH). Por otra parte, la formación del HAF era detectada cuando el folículo no colapsaba, el puntillado ecogénico en el fluido folicular era cada vez más intenso y la capa granulosa del folículo aumentaba tanto su ecogenicidad como el grosor (Cuervo-Arango y Newcombe, 2012). La verificación de preñez se realizó por ecografía transrectal del tracto reproductivo a los 15 días post-ovulación.

Punción intrafolicular

Se realizó punción ecoguiada del folículo preovulatorio, cuando el mismo presentaba un diámetro ecográfico $\geq 35\text{mm}$ y presencia de moderado edema uterino, evidenciado por el grado de plegamiento endometrial. Las punciones fueron efectuadas por los mismos operarios, los cuáles contaban con entrenamiento previo en la técnica de punción. La misma se realizó a través del flanco, con la yegua en estación en una manga ginecológica, sedada previa-

mente con detomidina (0.01 mg /Kg, i.v.), butorfanol (0.02 mg /Kg, i.v.) y anestesiada localmente usando una solución de clorhidrato de lidocaína al 2% colocada con la técnica de bloqueo en "L" invertida. Se realizó rasurado y antisepsia de la zona de acuerdo a las pautas de una cirugía convencional. Las punciones intrafoliculares fueron realizadas por un operario que, mediante ecografía, dirigía una aguja espinal 18G al folículo preovulatorio mientras otro operario sujetaba transrectalmente el ovario a punzar contra la pared del flanco. En el grupo control, el folículo preovulatorio fue inyectado con 0,5ml de agua de inyección estéril, mientras que, en las yeguas pertenecientes al grupo tratado, el folículo preovulatorio fue inyectado con una solución conteniendo 750 μg de PGF_{2α} (Lutalyse) diluidos en 0,5ml de agua estéril. La dosis empleada en el experimento fue más elevada que las concentraciones fisiológicas medidas en el líquido folicular previo a la ovulación, siendo 10 ng/mL de PGF_{2α}, tal como se mencionó en un estudio realizado por Sirois y Doré (1997).

Inseminación artificial

Inmediatamente antes de la punción, las yeguas fueron inseminadas con semen fresco con una concentración de 500×10^6 de espermatozoides con motilidad progresiva procedentes de un padrillo con fertilidad conocida. La inseminación artificial se repitió a las 48 h, realizada la misma, en caso de que las yeguas no ovularan.

Imágenes ecográficas y muestras de sangre

Se tomaron imágenes ultrasonográficas cada 12 h del folículo punzado para el seguimiento del mismo y determinar el momento de la ovulación. Además, se tomaron muestras de sangre heparinizada de la vena yugular desde el momento de la punción y cada 48 h durante 10 días para determinar y evaluar las concentraciones plasmáticas de progesterona en ambos grupos.

Determinación de las concentraciones plasmáticas de Progesterona (P₄)

El plasma obtenido del grupo control y del grupo tratado fue congelado y enviado al Laboratorio Central perteneciente al Sanatorio Allende, Córdoba, Argentina. Allí se realizó el dosaje de P₄ por medio del método de electroquimioluminiscencia (EQL).

RESULTADOS

Los resultados de las principales variables evaluadas: tamaño folicular al momento de la punción, tasa de ovulación (%), intervalo punción – ovulación y tasa de preñez se describen en la Tabla 1.

Con respecto al grupo control, el 100% (6/6) de las yeguas ovuló. Aparentemente, la administración de 0.5 ml de agua de inyección estéril en el folículo preovulatorio no alteró el proceso de ovulación, ya que permitió que los eventos fisiológicos principales ocurrieran normalmente y que se liberara un ovocito capaz de ser fertilizado por un espermatozoide, evidenciándose con la presencia de una vesícula embrionaria a los 15 días post-ovulación. En cuanto al grupo tratado, cinco de las seis yeguas (83%), a las cuales se inyectó con $\text{PGF}_{2\alpha}$ al folículo preovulatorio, tuvieron fallas en la ovulación la cual se evidenció con la formación de HAF's a las $90,4 \pm 18,02$ h. En este sentido, la administración de altas dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el folículo preovulatorio alteró el proceso normal de la ovulación. La Figura 1 muestra la evolución de un HAF del grupo tratado con $\text{PGF}_{2\alpha}$. El folículo preovulatorio punzado presentó un puntillado ecogénico intenso, el cual se movía libremente en el fluido folicular. No se produjo colapso folicular y la capa granulosa del folículo aumentó su ecogenicidad y grosor, tal como ha sido descrito en la bibliografía. En los días posteriores a la punción, el diámetro folicular aumentó, y en algunas ocasiones el puntillado intrafolicular comenzó a organizarse mostrando un entramado de fibrina debido a la coagulación del contenido antral. Sólo una de las yeguas a la que se punzó intrafolicularmente con $\text{PGF}_{2\alpha}$ ovuló (Fig. 2) pero no se obtuvo preñez. Con respecto a las concentraciones plasmáticas de P_4 , se observa que las yeguas tratadas con agua de inyección (grupo control) comienzan a subir sus niveles de P_4 entre las 12 y 24 h post-ovulación, mientras que la única yegua que ovuló del grupo tratado lo hace después de las 48 h y las cinco yeguas del mismo grupo que no ovularon y formaron un HAF se observó el aumento de P_4 después de las 96 h (Fig. 3).

DISCUSIÓN

El rol de las prostaglandinas en el proceso ovulatorio es fundamental, tal como se demostró anteriormente y en un estudio reciente realizado por Martínez-Boví y Cuervo-Arango (2016a), en el cuál las yeguas habían respondido a la administración

intrafolicular de prostaglandinas con colapso del folículo preovulatorio dentro de las 12 h post tratamiento. Por el contrario, en el presente estudio, la única yegua del grupo tratado que ovuló lo hizo 96 h post-punción, es decir, la ovulación se produjo más tardíamente con la inyección intrafolicular de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sola.

Hasta el momento se sabe que es necesaria la utilización de ambos tipos de prostaglandinas (PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$) para inducir la ovulación normal con éxito. Sin embargo, los resultados del presente estudio indicarían que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ por sí sola y a esa concentración no sería capaz de permitir la ovulación normal en la mayoría de yeguas que fueron utilizadas en este experimento. Un estudio previo comparó el efecto de la PGE_1 , PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre la tasa de ovulación en ratas tratadas con indometacina. Las prostaglandinas de la serie E, y especialmente PGE_1 , inhibieron la ruptura folicular anormal y restablecieron la ovulación. En cuanto a la $\text{PGF}_{2\alpha}$, fue eficaz parcialmente en la restauración de la ovulación (Gaytán *et al.*, 2002). En un estudio reciente, se ha descrito el rol importante que tiene la PGE_2 en el proceso ovulatorio de diferentes especies, particularmente en eventos clave como la expansión del cúmulo, la maduración de los ovocitos y la degradación de la pared folicular (Niringiyumukiza *et al.*, 2018). Junto a esta línea de investigación, se ha demostrado previamente que la PGE_2 induce consistentemente la expansión del cúmulo y estimula la secreción de ácido hialurónico en las células del cúmulo a través de PTGER_2 , lo que sugiere un papel crítico para este receptor de PGE_2 en los procesos necesarios para la expansión del cúmulo de primates. Incluso se ha propuesto que los antagonistas de los receptores PGE_2 podrían servir como anticonceptivos no hormonales efectivos para las mujeres (Peluffo *et al.*, 2014). Estos datos indican que las prostaglandinas de la serie E, es quien desempeña un papel crucial en la ovulación, permitiendo así la liberación del ovocito.

Si bien se conoce que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ está presente en el fluido folicular del folículo preovulatorio a concentraciones relativamente bajas, 40 y 10 ng/ml de PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ respectivamente (relación 4:1) (Siróis y Doré, 1997), la dosis utilizada en este ensayo fue muy superior a la concentración fisiológica y podría haber inducido un efecto contraproducente llevando al bloqueo de la ovulación y a la formación de

HAF's. Tal vez el equilibrio entre estas prostaglandinas es fundamental para que el proceso ovulatorio se desarrolle correctamente.

Con respecto a las concentraciones de P_4 , un estudio anterior determinó que el primer aumento significativo ocurrió entre las 12 y 24 h (0,5 vs 1,1ng/ml) después del final de la evacuación completa del folículo, continuó entre 24 y 36 h (1,1 vs 2,6ng/ml) y aumentó gradualmente hasta 96 h después de la ovulación (13,8ng/ml) (Townson *et al.*, 1989). En el presente estudio se pudo observar que las yeguas punzadas con agua de inyección elevaron sus concentraciones de P_4 dentro de los tiempos esperados o fisiológicos, mientras que el aumento de la P_4 se vio aparentemente retrasado en el tiempo en aquellas yeguas tratadas intrafolicularmente con $PGF_{2\alpha}$, seguramente debido a la consecuente formación de un HAF's en 5 de las 6 yeguas del grupo tratado. Contrariamente a lo esperado, la única yegua de ese grupo que ovuló a las 96 h post-punción experimentó un aumento significativo de P_4 (7,63 ng/ml), pudiendo atribuirse este resultado a la ovulación doble que sucedió en esta yegua, es decir, 24 h antes de ovular el folículo punzado, se produjo la ovulación de un folículo no punzado del ovario contralateral. Así lo reporta un estudio que determinaba el diámetro del cuerpo lúteo y los niveles séricos de P_4 durante el ciclo estral en yeguas criollas colombianas, donde la única yegua que presentó ovulación doble, tuvo los niveles séricos de P_4 más altos durante el diestro, de todas las yeguas de ese estudio (Paredes *et al.*, 2013). Por lo tanto, aquellas que presentan ovulación doble tienen aumentos significativos en los niveles de P_4 sérica, 24 horas después de la segunda ovulación (Daels *et al.*, 1993).

En este estudio la formación de HAF se evidenció ecográficamente a las $90,4 \pm 18,02$ h post-punción. Desafortunadamente, un HAF puede tener semejanza morfológica con un cuerpo hemorrágico (Ginther *et al.*, 2007), lo que puede complicar el diagnóstico preciso de la ovulación, especialmente cuando las yeguas no se examinan frecuentemente. Las características ecográficas del HAF han sido mencionadas al principio de este estudio, pero el único parámetro que permite un diagnóstico definitivo es el grosor de la pared lútea. Esto es < 3 mm en HAF en contraste con > 5 mm en el cuerpo hemorrágico. Sin embargo,

esto solo se aplica cuando la estructura no identificada tiene un contenido antral desorganizado (Cervo-Arango y Newcombe, 2012).

La mayoría de los folículos anovulatorios (88.1%) (Lefranc y Allen, 2003) eventualmente se luteinizan e inducen elevación de la P_4 en las yeguas afectadas. Un estudio demostró que gran parte de estos HAF's se comporta como CL's normales mientras que, con menos frecuencia, los valores de P_4 no superaron 1ng/ml indicando ausencia de tejido luteal activo (McCue y Squires, 2002). En el presente estudio, en las yeguas del grupo tratado que formaron HAF las concentraciones de P_4 comenzaron a elevarse > 1 ng/ml a partir del cuarto día post-punción, comportándose aparentemente como CL normales a pesar de no ovular. A las 244 h post-inyección de $PGF_{2\alpha}$ las concentraciones de P_4 se habían elevado hasta 5,11 ng/ml en promedio.

CONCLUSIÓN

A pesar del escaso número de animales utilizados en este estudio, se puede observar que la administración intrafolicular de 750 μ g de $PGF_{2\alpha}$ en el folículo preovulatorio en la yegua aparentemente no permitiría la ovulación normal y contrariamente a lo esperado induciría la formación de folículos hemorrágicos anovulatorios como consecuencia de un bloqueo en el proceso ovulatorio. Por lo tanto, no podría utilizarse como posible tratamiento ante fallos ovulatorios. Además, con los resultados obtenidos podría sugerirse que el equilibrio entre la PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$ (relación 4:1, mencionada con anterioridad) sería fundamental para que la ovulación se desarrolle correctamente.

Se deberían realizar más investigaciones para determinar la función exacta que desempeña la $PGF_{2\alpha}$ en el proceso ovulatorio y la dosis a administrar para poder inducir la ovulación en la yegua. Además, con un mayor número de animales y de distintas razas, se deberían realizar estudios similares utilizando sólo análogos de PGE_2 y de esta manera poder afirmar si ambas prostaglandinas serían necesarias o no en el proceso ovulatorio.

Figura 1 - Evolución ecográfica de folículo punzado intrafolicularmente con $\text{PGF}_{2\alpha}$ en yegua. Nótese la formación de un HAF post-punción. A) Folículo preovulatorio pre-punción intrafolicular, cuyo fluido folicular es anecoico. B) Folículo preovulatorio inmediatamente post-punción intrafolicular (Hora 0). C) 84 h post-punción. Se observa un leve puntillado ecogénico que flota y se mueve libremente en el fluido folicular. La pared folicular aumenta su ecogenicidad y grosor. D) 96 h post-punción. El puntillado en la cavidad antral y se observan algunos entramados de fibrina. E) 108 h post-punción. El folículo preovulatorio en lugar de ovular, aumenta su tamaño. Hay un entramado de fibrina y un puntillado ecogénico intenso, evidenciándose de esta manera la formación de un HAF. F) 120 h post-punción. El contenido antral aún se encuentra desorganizado. G) 132 h post-punción. El contenido antral se coagula y organiza. H) 204 h post-punción. Se observa una estructura similar a un CL, cuyo contenido se encuentra organizado y es homogéneo.

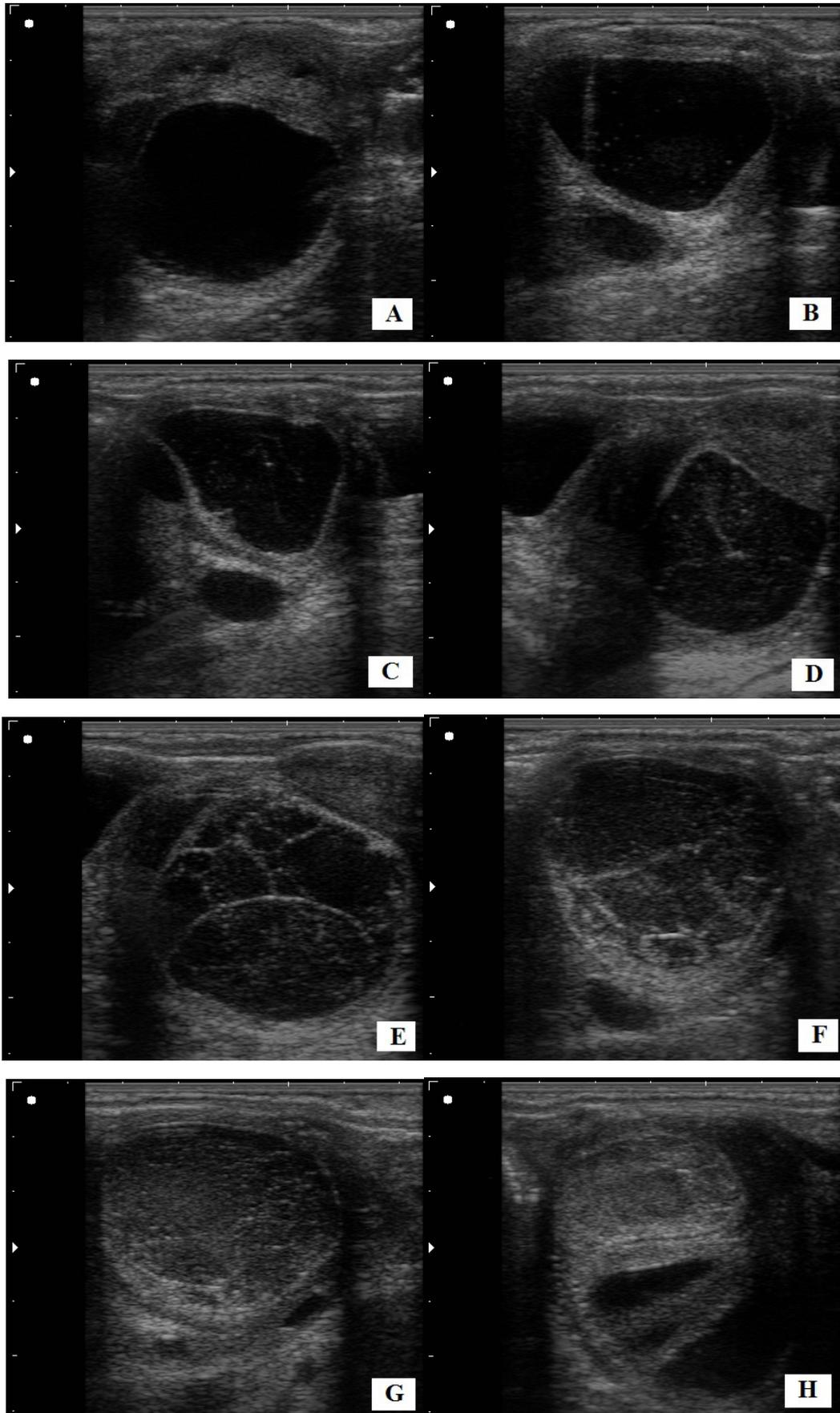


Figura 2 - Evolución ecográfica de folículo punzado intrafolicularmente con $\text{PGF}_{2\alpha}$ en yegua. Nótese la formación de un CL post-ovulación. A) Folículo preovulatorio pre-punción intrafolicular, cuyo fluido folicular es anecoico. B) Folículo preovulatorio inmediatamente post-punción intrafolicular (Hora 0). C) 84 h post-punción. El folículo adopta una forma piriforme con un "ápex" que se orienta hacia la fosa de la ovulación. Opuesto a esta región, se encuentra el hemisferio basal con un borde aserrado el cuál puede considerarse como un signo de ovulación inminente (Gastal, 2011). D) 96 h post-punción. Momento en que se detecta la ovulación. Se evidencia un colapso completo del folículo preovulatorio y evacuación del fluido folicular. E) 120 h post-punción. Se observa un área sólida hiperecótica en la zona del ovario en que se encontraba el folículo preovulatorio, el cuál se corresponde con la formación de un CL sólido con 24 h post-ovulación. F) 132 h post-punción. Se observa un CL ecogénico, de límites bien definidos, con 36 h post-ovulación.

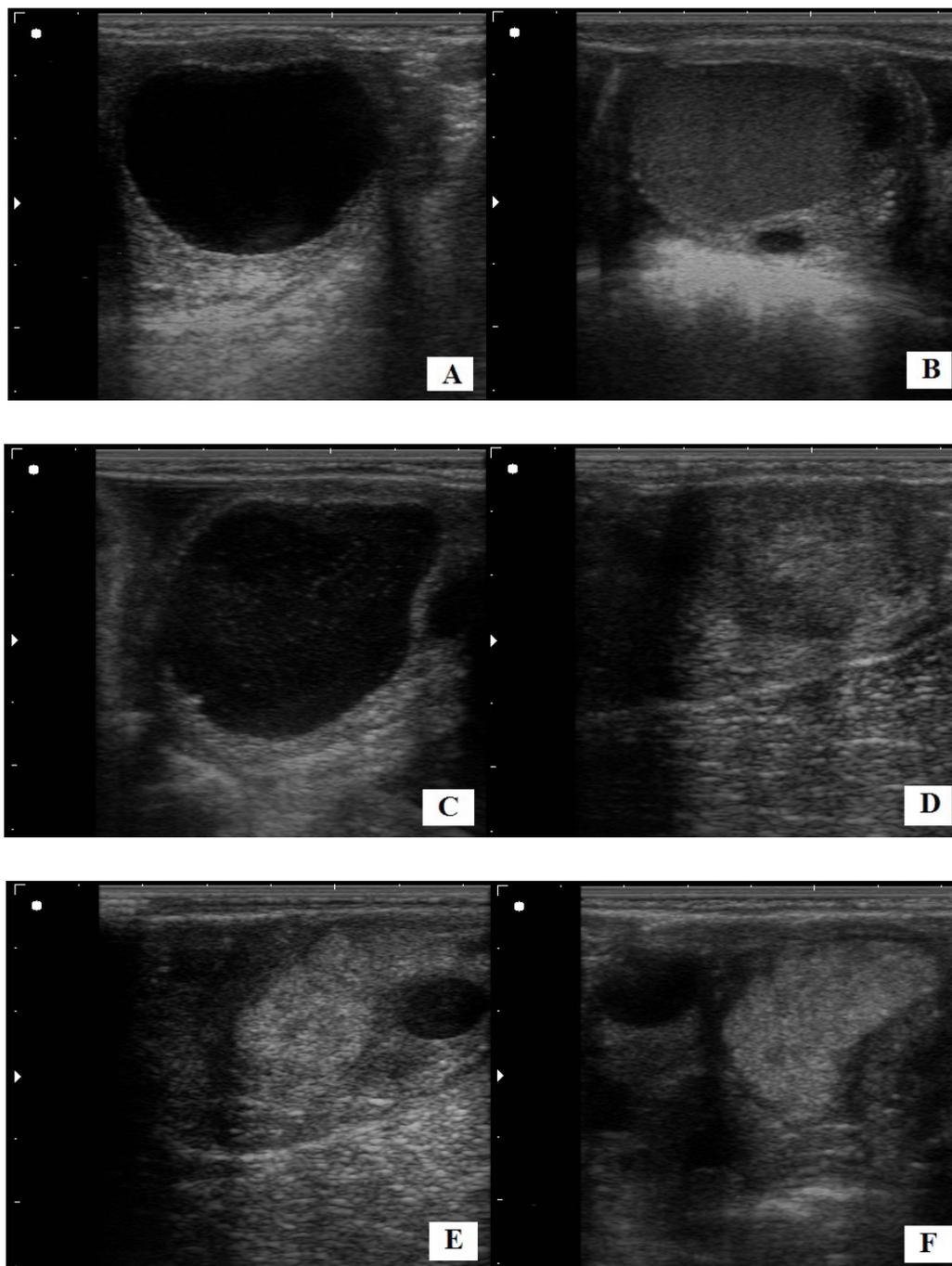
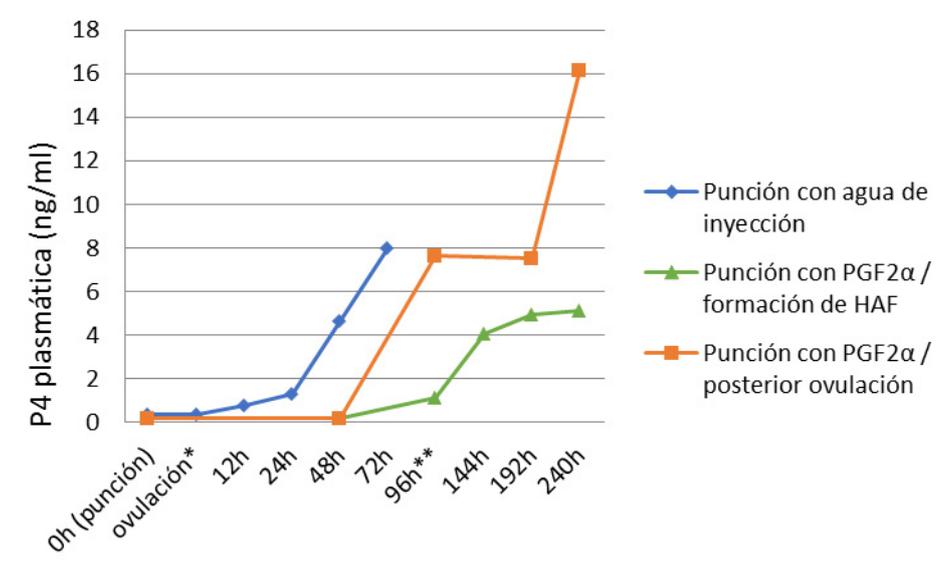


Figura 3 - Concentraciones plasmáticas de P₄ del grupo control (línea azul) y del grupo tratado: yeguas con punción intrafolicular de PGF2 α que formaron HAF's (línea verde) y aquella yegua punzada intrafolicularmente con PGF2 α que ovuló normalmente (línea naranja).



*Ovulación en yeguas del grupo control

** Ovulación en la yegua del grupo tratado

Tabla 1. Tamaño folicular al momento de la punción, % de ovulación, intervalo punción – ovulación y tasa de preñez.

Grupo	Tamaño folicular al momento de la punción	% de ovulación	Intervalo punción-ovulación	Tasa de preñez
Control	34,9 \pm 1,8 mm	100 % (6/6)	90 h \pm 50,8 h	66,7% (4/6)
Tratamiento	35,7 \pm 1.2 mm	16,6% (1/6)	96 h*	0 % (0/6)
P<0.003				P<0.01

*En base a la única yegua que ovuló del grupo tratado.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNRC por el subsidio otorgado para la realización del Proyecto y Programa de Investigación (PPI) 2016-2018, resolución rectoral #161/16. Además, agradecemos al Consejo Interuniversitario Nacional (CIN) por otorgar la Beca de Estímulo a las Vocaciones Científicas (EVC) logrando la realización de este trabajo de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J., Liu, Z., Ren, Y. A., Wun, W. S., Zhou, W., Kenigsberg, S., Librach, C., Valdes, C., Gibbons, W., Richards, J. (2016). Enhanced inflammatory transcriptome in the granulosa cells of women with polycystic ovarian syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 101 (9): 3459-3468.
- Aguilar, J., Castañeira, C., Alonso, C., Flores, A., Marín, J., Cuervo-Arango, J., Martínez-Boví, R., Mougelar, H., Losinno, L. (2018). Intrafollicular injection of prostaglandins in the preovulatory follicle of the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*. 66: 183.
- Aguilar, J., Cuervo-Arango, J., Losinno, L. (2015). Folículos Hemorrágicos Anovulatorios en la yegua. Nuevos conceptos sobre un viejo problema en clínica reproductiva. *Biotechnologías Reproductivas en Equinos I*. FAVE Eds (ISBN 978-987-45862-1-6). 173-187.
- Conti, M., Hsieh, M., Park, J. Y., Su, Y. Q. (2006). Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Molecular Endocrinology*. 20 (4): 715-723.
- Couse, J. F., Yates, M. M., Deroo, B. J., Korach, K. S. (2005). Estrogen receptor- β is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. *Endocrinology*. 146 (8): 3247-3262.
- Cuervo-Arango, J. & Domingo-Ortiz, R. (2011). Systemic treatment with high dose of flunixin-meglumine is able to block ovulation in mares by inducing hemorrhage and luteinisation of follicles. *Theriogenology*. 75: 707-714.
- Cuervo-Arango, J. & Newcombe, J.R. (2010). Risk factors for the development of haemorrhagic anovulatory follicles in the mare. *Reproduction in Domestic Animals*. 45: 473-480.
- Cuervo-Arango, J. & Newcombe, J.R. (2012). Ultrasound characteristics of experimentally induced luteinized unruptured follicles (LUF) and naturally occurring hemorrhagic anovulatory follicles (HAF) in the mare. *Theriogenology*. 77: 514-524.
- Daels, P. F. & Hughes, J. P. (1993). The normal estrous cycle. In McKinnon, A. O. and Voss J. L., editors: *Equine Reproduction*, 1st Edition. Philadelphia: Lea and Febiger. 121-132.
- Edelman, A.B, Jensen, J.T., Doom, C., Hannebold, J.D. (2013). Impact of the prostaglandin synthase-2 inhibitor celecoxib on ovulation and luteal events in women. *Contraception*. 87: 352 – 357.
- Gastal, E. L. (2011). Ultrasonographic morphologic of the preovulatory follicle. In Mckinnon, A. O.; Squires E. L.; Vaala, W. E.; Varner, D. D., editors: *Equine Reproduction*, 2nd Edition. United Kingdom: Wiley-Blackwell. 2032-2054.
- Gaytán, F., Tarradas, E., Bellido, C., Morales, C., Sánchez-Criado, J. E. (2002). Prostaglandin E1 inhibits abnormal follicle rupture and restores ovulation in indomethacin-treated rats. *Biology of Reproduction*. 67 (4):1140-1147.
- Gérard, N. & Robin, E. (2019). Cellular and molecular mechanisms of the preovulatory follicle differentiation and ovulation: What do we know in the mare relative to other species. *Theriogenology*. 160: 163-179.
- Ginther, O. J., Gastal, E. L., Gastal, M. O., Beg, M. A. (2008). Dynamics of the equine preovulatory follicle and periovulatory hormones: what's new? *Journal of Equine Veterinary Science*. 28 (8): 454-460.
- Ginther, O.J., Beg, M.A., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Cooper, D.A. (2009). Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17β -decrease and a more rapid LH increase in mares. *Animal Reproduction Science*. 114: 311-317.
- Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Beg, M.A. (2007). Incidence, endocrinology, vascularity, and morphology of hemorrhagic anovulatory follicles in mares. *Journal of Equine Veterinary Science*. 27: 130-139.

- Hsieh, M., Lee, D., Panigone, S., Horner, K., Chen, R., Theologis, A., Lee, D.C., Threadgill, D.W., Conti, M. (2007). Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Molecular and cellular biology*. 27 (5): 1914-1924.
- Kim, J., Bagchi, I. C., Bagchi, M. K. (2009). Control of ovulation in mice by progesterone receptor-regulated gene networks. *Molecular human reproduction*. 15 (12): 821-828.
- Larentis, G.R., Bastos, H.B.A., Camozzato, G.C., Santos, G.O., Mattos, R.C. (2018). Do therapeutic doses of phenilbutazone affect ovulation process in mare. *Journal of Equine Veterinary Science*. 66: 150-151.
- Lefranc, A. C. & Allen, W. R. (2003). Incidence and morphology of anovulatory haemorrhagic follicles in the mare. *Pferdeheilkunde*. 19 (6): 611-612.
- Li, Q., Jimenez-Krassel, F., Kobayashi, Y., Ireland, J.J., Smith, G.W. (2006). Effect of intrafollicular indomethacin injection on gonadotropin surge-induced expression of select extracellular matrix degrading enzymes and their inhibitors in bovine preovulatory follicles. *Reproduction*. 131: 533-544.
- Lim, H., Paria, B. C., Das, S. K., Dinchuk, J. E., Langenbach, R., Trzaskos, J. M., Dey, S. K. (1997). Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*. 91 (2): 197-208.
- Martínez-Boví, R. & Cuervo-Arango, J. (2016a). Follicle Diameter and Systemic Hormone Interrelationships during Induction of Follicle Collapse with Intrafollicular Prostaglandin E2 and F2 α in Mares. *Reproduction in Domestic Animals*. 51: 322-329
- Martínez-Boví, R. & Cuervo-Arango, J. (2016b). Intrafollicular treatment with prostaglandins PGE2 and PGF2 α inhibits the formation of luteinized unrupture follicles and restores normal ovulation in mares treated with flunixin-meglumine. *Equine Veterinary Journal*. 48: 211 – 217
- McCue, P. M. & Squires, E. L. (2002). Persistent anovulatory follicles in the mare. *Theriogenology*. 58 (2-4): 541-543.
- Murdoch, W. J., Hansen, T.R., McPherson, L.A. (1993). A Review - Role of eicosanoids in vertebrate ovulation. *Prostaglandins*. 46: 85-115
- Niringiyumukiza, J. D., Cai, H., Xiang, W. (2018). Prostaglandin E2 involvement in mammalian female fertility: ovulation, fertilization, embryo development and early implantation. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 16: 43.
- Paredes, P., Jiménez, C., Hernández, A. (2013). Corpus luteum diameter and serum progesterone level, during the estrous cycle in colombian criollo mares. *Revista MVZ Córdoba*. 18 (3): 3829-3835.
- Peluffo, M.C., Stanley, J., Braeuer, N., Rotgeri, A., Fritzeimer, K.H., Fuhrmann, U., Buchmann B., Adevai, T., Murphy, M.J., Zelinski, M.B., Lindenthal, B., Hennebold, J.D., Stouffer, R.L. (2014). A prostaglandin E2 receptor antagonist prevents pregnancies during a preclinical contraceptive trial with female macaques. *Human Reproduction*. 29 (7): 1400-1412.
- Pérez, R. S., Jiménez L.M., Gómez Danés A.A., Casiano Ventura M. A., Quero Carrillo A.R., Pérez Rodríguez, P. (2016). Piroxicam and ovarian changes in adult goat. *Nova Scientia*. 8: 91-105.
- Richards, J. S. (2018). Ovulation. *Elsevier*. 92-98
- Robker, R.L., Russell, D.L., Yoshioka, S., Sharma, S.C., Lydon, J.P., O'Malley, B.W., Espey, L.L., Richards, J.S. (2000). Ovulation: a multi-gene, multistep process. *Steroids*. 65: 559-570.
- Sirois, J & Doré, M. (1997). The Late Induction of Prostaglandin G/H Synthase-2 in Equine Preovulatory Follicles Supports Its Role as a Determinant of the Ovulatory Process. *Endocrinology*. 138: 4427-34.
- Song, J.H, Curry, T.E., Brannstorm, M., LeMaire, W.J., Koods, R.D., Papkoff, H., Janson, P.O. (1987). Inhibition of follicle-stimulating hormone-induced ovulation by indomethacin in the perfused rat ovary. *Biology Reproduction*. 36: 536-42.
- Townson, D. H. & Ginther, O. J. (1987). Duration and pattern of follicular evacuation during ovulation in the mare. *Animal Reproduction Science*. 15 (1-2): 131-138.
- Townson, D. H., Pierson, R. A., Ginther, O. J. (1989). Characterization of plasma progesterone concentrations for two distinct luteal morphologies in mares. *Theriogenology*. 32 (2): 197-204.