

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Medicina y Cirugía Animal



Efecto de la hiperprolactinemia y el  
tratamiento intrafolicular de  
prostaglandinas E2 y F2 $\alpha$  sobre la  
ovulación y la fertilidad en la yegua

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

Rebeca Martínez Boví

DIRIGIDA POR:

Dr. Juan Cuervo-Arango Lecina

Dra. Rosana Domingo Ortiz

**Valencia, 2016**



**Universidad Cardenal Herrera-CEU**

Departamento de Medicina y Cirugía Animal



Efecto de la hiperprolactinemia y el  
tratamiento intrafolicular de  
prostaglandinas E2 y F2 $\alpha$  sobre la  
ovulación y la fertilidad en la yegua

TESIS DOCTORAL

Rebeca Martínez Boví

Valencia

2016



La Tesis Doctoral titulada “Efecto de la hiperprolactinemia y el tratamiento intrafolicular de prostaglandinas E2 y F2 $\alpha$  sobre la ovulación y la fertilidad en la yegua” será presentada en la modalidad de tesis por compendio de publicaciones. Los artículos originales incluidos son los siguientes:

- I. **Martínez-Boví R, Zagrajczuk A, Domingo-Ortiz R & Cuervo-Arango J** 2014 The effect of sulpiride treatment during the periovulatory period on prolactin concentration and ovulation in the mare. *J Equine Vet Sci* **34** 1170-1144.
  
- II. **Martínez-Boví R & Cuervo-Arango J** 2016 Intrafollicular treatment with prostaglandins PGE2 and PGF2 $\alpha$  inhibits the formation of luteinized unruptured follicles and restores normal ovulation in mares treated with flunixin-meglumine. *Equine Vet J* **48** 211-217.
  
- III. **Martínez-Boví R & Cuervo-Arango J** 2016 Follicle diameter and systemic hormone interrelationships during induction of follicle collapse with intrafollicular prostaglandin E2 and F2 $\alpha$  in mares. *Reprod Domest Anim* **51** 322-329.



# Autorización del director y codirectora para la presentación de Tesis por compendio de publicaciones

---

Juan Cuervo-Arango Lecina, profesor de la Universidad CEU Cardenal Herrera en calidad de director, y Rosana Domingo Ortiz, profesora de la Universidad CEU Cardenal Herrera en calidad de codirectora, autorizan a que la doctoranda Rebeca Martínez Boví presente el trabajo titulado “Efecto de la hiperprolactinemia y el tratamiento intrafolicular de prostaglandinas E2 y F2α sobre la ovulación y la fertilidad en la yegua”, en la modalidad de tesis por compendio de publicaciones.

Esta tesis se ha realizado dentro del grupo de investigación de la Universidad CEU Cardenal Herrera titulado “Endocrinología y fisiopatología de la reproducción en rumiantes y équidos” dentro de la línea de “Fisiopatología del síndrome del folículo anovulatorio luteinizado en yeguas”.

Los tres artículos que componen esta tesis se han publicado en tres revistas internacionales indexadas JCR en la categoría de “Veterinary Sciences”. Una de las revistas está situada en el primer cuartil (Q1) de las 138 revistas que componen dicha categoría, otra en el segundo cuartil (Q2), mientras que la restante está situada en el tercer cuartil (Q3). La primera revista es “*Journal of Equine Veterinary Science*” con un índice de impacto de 0.730 (JCR 2015), ocupando la posición global de 83/138. La segunda es “*Equine Veterinary Journal*” con un índice de impacto de 2.475 (JCR 2015), ocupando la posición 8/138. Por último, la tercera revista científica es “*Reproduction in Domestic Animals*” con un índice de impacto de 1.210 (JCR 2015) situada en la posición 44/138. Los tres artículos indicados previamente cumplen los requerimientos de calidad que exige la normativa de la Universidad CEU Cardenal Herrera para poder ser presentados en el formato de tesis por compendio de publicaciones.

Esta tesis doctoral ha sido financiada por la Universidad CEU Cardenal Herrera, proyectos precompetitivos ref. PRCEU-UCH 13/14 y ref. FUSP-CEU-BSS-PPC-01-2014, así como por la Generalitat Valenciana, ayudas a proyectos precompetitivos de investigación ref. GV-129/14.

La contribución e implicación de la doctoranda Rebeca Martínez Boví a este trabajo de investigación ha sido integral, tomando la iniciativa en la obtención de todos los datos experimentales así como en la participación activa en el diseño experimental de los diferentes estudios, análisis de resultados y escritura de los tres manuscritos que han dado lugar a los

artículos que se presentan en esta tesis por compendio de publicaciones. Finalmente, Rebeca ha sobrepasado con creces los mínimos requeridos por la normativa en el formato y escritura del trabajo de tesis doctoral, realizando una excelente y amplia revisión bibliográfica en el área de interés como texto introductorio a los artículos del compendio.

Los trabajos tienen un carácter original, ampliando el conocimiento sobre la fisiopatología del síndrome del folículo anovulatorio en la yegua. Además, el novedoso protocolo terapéutico desarrollado en esta tesis doctoral, mediante el uso de prostaglandinas intrafoliculares, abre las puertas a una nueva línea de investigación en la que se pueda determinar su efecto en yeguas con tendencia a desarrollar folículos hemorrágicos anovulatorios de forma espontánea.



Fdo.: Rosana Domingo Ortiz



Fdo.: Juan Cuervo-Arango Lecina,

Alfara del Patriarca, a 11 de abril de 2016



*“TODO PARECE IMPOSIBLE HASTA QUE SE HACE”*

*Nelson Mandela*





*Dedicada a mi familia...*





# AGRADECIMIENTOS

---

*Todo comenzó por diciembre de 2012, cuando en la bandeja de entrada de mi correo abrí un mail con un asunto muy interesante y un archivo adjunto: “artículos HAF.zip”. Y como no podía ser de otra manera, es el remitente de ese mail la persona que encabeza esta sección de agradecimientos.*

*A mi director de tesis, Juan, gracias por haber sido durante todo este tiempo mi guía, por haberme abierto las puertas de este gran mundo de la investigación, por tu constancia y perseverancia, por todos los comentarios y correcciones, por tu paciencia, por tu ayuda en la parte experimental, y en todas las fases de esta tesis doctoral. Gracias por haberme hecho crecer, madurar y aprender sobre los folículos hemorrágicos anovulatorios y también sobre la vida. Te voy a echar mucho de menos, amigo.*

*A Rosana, gracias por confiar en mí desde mucho antes del comienzo de esta tesis doctoral. También, gracias por tu ayuda en esta recta final.*

*A todas las personas que me ayudaron con la parte experimental, muy especialmente a Sandra, Santi, Eva y Aida, mi “HAF team”, gracias por vuestra implicación e ilusión y por hacer mucho más llevaderos esos días eternos de ecografías y punciones foliculares. También a los trabajadores de la granja, Alejandro, Fernando, M<sup>a</sup> Carmen...gracias por estar siempre dispuestos a ayudarme o simplemente por regalarme vuestras sonrisas cada mañana. También gracias a todos aquellos que me ofrecieron su ayuda en los laboratorios de investigación, al grupo de anatomía patológica, especialmente a Mariola, Ana y David, que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y prestarme sus micropipetas de precisión, y la bendita pipeta multicanal! También, gracias Enric por tu apoyo en mi relación con “Victor®” y con ELISA.*

*A Sento, alias Mr.9, muchas gracias por tu ayuda con Mr. Photoshop y por hacer que “una imagen valga más que mil palabras”.*

*A mi hermana Moni, gracias por esa corrección gramatical que, sin duda, me permitirá una lectura más “pausada”. También gracias a Pablo, por la revisión en tiempo récord...*

*A la Universidad CEU Cardenal Herrera, gracias porque sin las instalaciones y financiación, este proyecto no hubiera sido posible.*

*A Xavier y a sus doctorandos, Bushra y Jason, gracias por abrirme las puertas de Roslin, y por hacer que mi estancia en Edimburgo fuera tan agradable.*

*A Jon, muchas gracias por tus consejos y por hacer “más accesible” la ciencia, ya me entiendes...jejeje.*

*A la yeguada de la Mariposa. Gracias Rafa y Pili, por permitir que algunas de vuestras yeguas participaran en el estudio.*

*Gracias también a todas las yeguas que han participado en este estudio, en especial a Gala por su “particular” ovario izquierdo... ¡Todo un reto!*

*Y, como tampoco podía ser de otra manera, para acabar esta sección de agradecimientos quiero dar las gracias a todas las personas que siempre han estado a mi lado...*

*A mis padres, hermanas, sobrinas y cuñados, pero muy especialmente a mis padres, Joaquín y Cecilia. Muchísimas gracias porque hicisteis todo lo necesario para que pudiera hacer realidad mi sueño, ser veterinaria.*

*A Dimas, gracias por apoyarme durante 10 años y por ayudarme a crecer como veterinaria y como persona, por no dejarme decaer en los momentos duros y por estar a mi lado. Estarás siempre en mi corazón.*

*A mis amigas, muy especialmente a Mari y Sheila, gracias por los ánimos, por los “cachetes”, por vuestra paciencia, por estar a mi lado y sufrir conmigo los baches del camino, y por ser como sois. Os quiero. También a todos aquellos amigos que me han presionado para que acabe. Sé que lo hacéis porque me queréis. Yo también os quiero.*

*A Pablo, gracias por cruzarte en mi camino y por ser el equilibrio necesario para afrontar esta recta final.*

*Muchas gracias a todas las personas que, de una forma u otra, os habéis preocupado por mí durante estos 3 años de tesis doctoral.*

*A todos vosotros...*

*Muchas gracias.*

# INTRODUCCIÓN Y FUNDAMENTACIÓN GENERALES AL COMPENDIO DE PUBLICACIONES

---

En determinados ámbitos del conocimiento científico, se está instaurando una modalidad de Tesis doctoral consistente en el compendio de artículos publicados en revistas especializadas con un adecuado impacto, como resultado de la actividad investigadora desarrollada y la formación adquirida del doctorando. Esta alternativa, es comúnmente aceptada en prestigiosas Universidades Europeas y en España es cada vez más habitual.

En nuestra opinión, esta modalidad de tesis por compendio de publicaciones tiene una ventaja añadida sobre la modalidad original. El doctorando, no sólo adquiere el grado de doctor, sino que también publica sus experiencias en revistas científicas internacionales de prestigio en su área de conocimiento. De esta forma, se consiguen dos objetivos principales: en primer lugar, se confiere una mayor calidad objetiva al trabajo del doctorando, ya que éste con anterioridad a la defensa de la tesis, habrá sido evaluado críticamente por pares que actúan como revisores científicos anónimos. En segundo lugar, en el momento de la lectura de la tesis, los resultados de los estudios que forman la misma ya han sido publicados en un medio de alta difusión en el ámbito científico gracias al sistema de distribución propio de las revistas científicas indexadas en el JCR.

En este caso, el compendio de la tesis lo forman tres publicaciones con una clara unidad temática, la fisiopatología de los folículos hemorrágicos anovulatorios en la yegua. Para ello se dividió el estudio en dos fases. En la primera fase, experimento 1, se determinó el efecto de la hiperprolactinemia sobre la ovulación y el desarrollo de folículos hemorrágicos anovulatorios, ya que niveles plasmáticos elevados de prolactina se han relacionado en anteriores estudios con el fallo ovulatorio (Artículo I). La segunda fase del estudio se dividió en dos experimentos para valorar el efecto del tratamiento de prostaglandinas E<sub>2</sub> y F<sub>2</sub>α administradas directamente dentro del folículo ovárico mediante punción intrafolicular ecoguiada. En la primera parte de esta segunda fase, correspondiente con el experimento 2, el tratamiento se administró en yeguas en las que se había inducido el desarrollo de folículos hemorrágicos anovulatorios mediante la administración sistémica de flunixin meglumine, un antiinflamatorio no esteroideo (Artículo II) y también se valoró la fertilidad. En la segunda parte de la segunda fase, experimento 3, se administró el tratamiento intrafolicular en el inicio del estro para determinar cómo éste afectaba a los niveles plasmáticos de hormonas y al colapso folicular con el objetivo de valorar la potencia

de dicho tratamiento y el papel de las prostaglandinas en el proceso de ovulación (Artículo III). Los resultados del trabajo doctoral se han publicado en tres revistas en las áreas pertinentes a la reproducción y a la especie equina, con buenos índices de impacto en el área general de ciencias veterinarias. La primera revista (Artículo I), "*Journal of Equine Veterinary Science*" está dedicada exclusivamente a investigación en equinos y ocupa la posición global de 83/138 dentro del área general de "*Veterinary Sciences*" con un factor de impacto de 0.730. La segunda revista (Artículo II), "*Equine Veterinary Journal*" ocupa la posición 8/138 dentro del área general de "*Veterinary Sciences*" con un factor de impacto de 2.475. La tercera revista (Artículo III), "*Reproduction in Domestic Animals*" está dedicada a la investigación en el área de reproducción en las diferentes especies domésticas y ocupa una posición global de 44/138 dentro del área general de "*Veterinary Sciences*" debido a su factor de impacto de 1.210. Una de las tres revistas está situada en el primer cuartil del área de ciencias veterinarias y las otras dos revistas, en el segundo y tercer cuartil (JCR 2015).



# ÍNDICE DE CONTENIDO

---

<b>RESUMEN</b> .....	<b>25</b>
<b>LISTADO DE ARTÍCULOS ORIGINALES</b> .....	<b>27</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>29</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>31</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>33</b>
1. FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL PERIODO PERIOVULATORIO .....	33
1.1. Endocrinología del periodo periovulatorio.....	33
1.2. Edema endometrial.....	34
1.3. Cambios en el folículo preovulatorio .....	34
1.4. Proceso de ruptura folicular .....	36
1.5. Liberación y maduración del ovocito.....	36
1.6. Inicio de la fase lútea .....	37
2. FALLO OVULATORIO: FOLÍCULOS HEMORRÁGICOS ANOVULATORIOS .....	37
2.1. Características ecográficas de los folículos hemorrágicos anovulatorios. ....	38
2.2. Características hormonales durante el periodo periovulatorio en yeguas con folículos hemorrágicos anovulatorios.....	39
2.3. Impacto sobre la fertilidad de la yegua.....	40
2.4. Factores de riesgo .....	40
2.5. Opciones de tratamiento .....	42
2.6. Inducción experimental de folículos hemorrágicos anovulatorios: folículos luteinizados anovulatorios.....	42
3. PAPEL DE LA PROLACTINA EN REPRODUCCIÓN .....	43
3.1. Patrón de liberación durante el ciclo reproductivo de la yegua .....	43
3.2. Estimulación de la secreción de prolactina mediante el uso de antagonistas de la dopamina .....	44
3.2.1. Inducción de la lactación.....	44
3.2.2. Adelantar la primera ovulación de la temporada reproductora.....	45
3.3. Efecto de la hiperprolactinemia sobre la ovulación .....	46
4. TÉCNICAS DE PUNCIÓN FOLICULAR EN YEGUAS.....	47
4.1. Punción del folículo a través del flanco .....	47
4.2. Punción transvaginal ecoguiada .....	48
5. HIPÓTESIS.....	50

## ÍNDICE

<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>51</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>53</b>
1. ANIMALES .....	53
2. EXAMEN ECOGRÁFICO DEL TRACTO GENITAL .....	53
3. TÉCNICA DE INYECCIÓN INTRAFOLICULAR .....	55
4. TRATAMIENTOS EMPLEADOS .....	55
4.1. Gonadotropina coriónica humana .....	55
4.2. Sulpirida .....	56
4.3. Flunixin meglumine .....	56
4.4. Solución de prostaglandinas E2 y F2 $\alpha$ .....	56
5. ANÁLISIS LABORATORIAL .....	56
5.1. Toma de muestras .....	56
5.2. Determinación hormonal mediante ELISA .....	57
5.3. Determinación hormonal mediante radioinmunoensayo (RIA) .....	57
6. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	58
6.1. FASE 1 .....	58
6.2. FASE 2 .....	58
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	60
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>61</b>
1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON SULPIRIDA DURANTE EL PERIODO PERIOVULATORIO EN LA YEGUA (I) .....	61
1.1. Efecto sobre la ovulación .....	61
1.2. Efecto sobre la concentración de PRL .....	62
1.3. Efecto sobre la concentración de LH .....	63
2. EFECTO DE LA INYECCIÓN INTRAFOLICULAR DE PROSTAGLANDINAS E2 Y F2 $\alpha$ EN LA YEGUA .....	65
2.1. Yeguas tratadas con hCG y flunixin meglumine en el periodo periovulatorio (II) .....	65
2.1.1. Efecto sobre la ovulación y el diámetro folicular .....	65
2.1.2. Efecto sobre la fertilidad .....	69
2.2. Yeguas en el inicio del estro (III) .....	70
2.2.1. Efecto sobre el colapso y diámetro folicular .....	70
2.2.2. Efecto sobre las concentraciones de LH, estrógenos y progesterona .....	73
2.2.3. Efecto sobre la duración del diestro .....	75

<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>77</b>
1. EFECTO DE LA HIPERPROLACTINEMIA SOBRE LA OVULACIÓN Y FORMACIÓN DE FOLÍCULOS HEMORRÁGICOS ANOVULATORIOS EN LA YEGUA (I).....	77
1.1. Efecto sobre la ovulación.....	77
1.2. Dosis de sulpirida y pauta de administración.....	78
2. EFECTO DEL TRATAMIENTO INTRAFOLICULAR DE PROSTAGLANDINAS E2 Y F2 $\alpha$ SOBRE LA OVULACIÓN Y LA FERTILIDAD EN YEGUAS (II Y III).....	79
2.1. Efecto sobre la ovulación.....	79
2.2. Efecto sobre la fertilidad.....	80
2.3. Dosis de prostaglandinas E2 y F2 $\alpha$ y momento de administración del tratamiento intrafolicular.....	81
2.4. Efecto sobre las concentraciones de LH, estrógenos y progesterona.....	81
3. POSIBLES APLICACIONES DEL TRATAMIENTO INTRAFOLICULAR DE PROSTAGLANDINAS E2 Y F2 $\alpha$ .....	83
4. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....	83
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>85</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>87</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>99</b>
<b>APÉNDICE</b> .....	<b>129</b>



# ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

---

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Efecto del tratamiento con sulpirida sobre la ovulación y formación de folículos luteinizados anovulatorios (LUF).....	61
<b>Tabla 2.</b> Características foliculares y diferentes eventos en el grupo control y tratamiento.....	70

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Concentración plasmática de prolactina (PRL) $\pm$ EEM en las yeguas tratadas con sulpirida y las controles después de la administración de hCG. ....	62
<b>Figura 2.</b> Concentración plasmática de prolactina (PRL) $\pm$ EEM en las yeguas tratadas con sulpirida y las controles normalizada al momento de la ovulación (hora 0).. ....	63
<b>Figura 3.</b> Concentración plasmática de hormona luteinizante (LH) $\pm$ EEM en las yeguas tratadas con sulpirida y las controles, normalizada al momento de la ovulación (hora 0).....	64
<b>Figura 4.</b> Imágenes ecográficas de una de las yeguas en su ciclo tratamiento antes de la punción del folículo preovulatorio (32 h PRE) y 15 min. (32 h POST) después.....	66
<b>Figura 5.</b> Imágenes ecográficas de una yegua en su ciclo control antes de la punción del folículo preovulatorio (32 h PRE) y 15 min (32 h POST) después, y durante la formación del LUF hasta 9 días después del inicio de su formación. ....	67
<b>Figura 6.</b> Imágenes ecográficas del folículo dominante de la yegua que ovuló en su ciclo control habiendo recibido el tratamiento con flunixin meglumine.....	68
<b>Figura 7.</b> Imágenes ecográficas de una de las yeguas en su ciclo tratamiento a las 24, 32 y 44 h después de la administración de hCG. ....	69
<b>Figura 8.</b> Imágenes ecográficas de la vesícula embrionaria de una de las yeguas en su ciclo tratamiento a los 14, 15 y 16 días post ovulación. ....	69
<b>Figura 9.</b> Imágenes ecográficas del folículo preovulatorio de una yegua en su ciclo tratamiento antes (0 h PRE) y 15 minutos después de la punción folicular (0 h POST). ....	71
<b>Figura 10.</b> Imágenes ecográficas del folículo preovulatorio de una yegua en su ciclo control antes (0 h PRE) y 15 minutos después de la punción folicular (0 h POST).. ....	72
<b>Figura 11.</b> Concentración plasmática de hormona luteinizante (LH) $\pm$ EEM en las yeguas tratadas y las controles desde el momento de la inyección intrafolicular (Hora 0).....	73

## ÍNDICE

**Figura 12.** Concentración plasmática de estrógenos totales y estradiol  $\pm$  EEM en las yeguas tratadas y las controles desde el momento de la inyección intrafolicular (Hora 0)..... 74

**Figura 13.** Concentración plasmática de progesterona  $\pm$  EEM en las yeguas tratadas y las controles después de la inyección intrafolicular (Hora 0) y a las 216 h (Día 9) del colapso folicular.. ..... 74

## RESUMEN

---

Los folículos hemorrágicos anovulatorios (HAF) son la patología anovulatoria más común en yeguas. Dicha condición es comparable a la que padecen las mujeres (folículos luteinizados anovulatorios), siendo una causa importante de infertilidad en medicina humana. La causa exacta por la que se producen estos folículos es todavía una incógnita, pero son muchos los factores que influyen en la inhibición de la ruptura folicular. Estudios en yeguas y en otras especies han demostrado que la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (PG) mediante administración de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en el periodo periovulatorio ha producido un alto porcentaje de folículos luteinizados anovulatorios. De forma fisiológica es la hormona luteinizante (LH) la que inicia la cascada de eventos que tienen como fin la ovulación, entre los cuales está la síntesis de PG dentro del folículo preovulatorio. Otro elemento que parece estar implicado en la formación de HAF son los niveles altos de prolactina como se ha demostrado en otras especies como la rata y el conejo. Un estudio reciente obtuvo resultados similares de producción de folículos luteinizados anovulatorios en yeguas mediante la administración de sulpirida, un antagonista de la dopamina que eleva la prolactina. El objetivo de esta tesis doctoral fue valorar el efecto de la prolactina y las prostaglandinas E2 y F2 $\alpha$  sobre la ovulación y fertilidad en la yegua.

La administración de sulpirida durante el periodo periovulatorio produjo un aumento de las concentraciones plasmáticas de prolactina. Sin embargo, esta hiperprolactinemia no tuvo ningún efecto sobre la ovulación ni sobre la formación de folículos hemorrágicos anovulatorios.

En yeguas tratadas con AINEs en el periodo periovulatorio, la administración intrafolicular de PGE2 y PGF2 $\alpha$  restableció la ovulación dentro de las 12 h tras la inyección, evitando la formación de folículos luteinizados anovulatorios. Además, supuso la correcta liberación y fertilización del ovocito, ya que las yeguas quedaron gestantes. Este mismo protocolo se empleó en yeguas al inicio del estro. En la mayoría de las yeguas se produjo el colapso folicular dentro de las 12 h siguientes a la administración del tratamiento. Esta fase del estudio reafirma el papel de las prostaglandinas en el proceso de ruptura de la pared y colapso folicular y sugiere que este hecho puede suceder incluso antes de la última fase de la onda preovulatoria de LH.





# LISTADO DE ARTÍCULOS ORIGINALES

---

Esta tesis doctoral está basada en los siguientes artículos originales:

I. **Martínez-Boví R, Zagrajczuk A, Domingo-Ortiz R & Cuervo-Arango J** 2014 The effect of sulpiride treatment during the periovulatory period on prolactin concentration and ovulation in the mare. *J Equine Vet Sci* **34** 1170-1144.

II. **Martínez-Boví R & Cuervo-Arango J** 2016 Intrafollicular treatment with prostaglandins PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> $\alpha$  inhibits the formation of luteinized unruptured follicles and restores normal ovulation in mares treated with flunixin-meglumine. *Equine Vet J* **48** 211-217.

III. **Martínez-Boví R & Cuervo-Arango J** 2016 Follicle diameter and systemic hormone interrelationships during induction of follicle collapse with intrafollicular prostaglandin E<sub>2</sub> and F<sub>2</sub> $\alpha$  in mares. *Reprod Domest Anim* **51** 322-329.



## ABREVIATURAS

---

AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
CL	Cuerpo lúteo
COX-2	Ciclooxigenasa-2
EEM	Error estándar de la media
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)
FSH	Follicle stimulating hormone (hormona folículo estimulante)
HAF	Haemorrhagic anovulatory follicle (folículo hemorrágico anovulatorio)
IA	Inseminación artificial
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
hCG	Human chorionic gonadotropin (gonadotropina coriónica humana)
LH	Luteinizing hormone (hormona luteinizante)
LUF	Luteinized unruptured follicle (folículo luteinizado anovulatorio)
PG	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 $\alpha$
PRL	Prolactina
RIA	Radioimmunoassay (radioinmunoensayo)



# INTRODUCCIÓN

---

Los mecanismos que regulan la ovulación en yeguas representan un extenso y excitante campo de investigación ya que hay aspectos moleculares implicados en el proceso que todavía se desconocen. La ovulación es, por tanto, un proceso complejo de mecanismos moleculares que incluye una cascada de eventos cuyo fin es la degradación y ruptura del folículo preovulatorio por el ápex, la consiguiente liberación del ovocito y el colapso folicular. Por ello, la ovulación es un paso esencial en el proceso de fertilización. La primera señal que inicia dicha cascada de eventos es el incremento preovulatorio en la concentración de hormona luteinizante (LH) en circulación sanguínea periférica (Russell & Robker 2007).

De todos los factores implicados en la ovulación, la enzima prostaglandina endoperoxidasa 2 (PGHS-2), también conocida como ciclooxigenasa-2 (COX-2), presente en las células de la granulosa y sus productos: las prostaglandinas E2 y F2 $\alpha$ , en el líquido folicular, han sido ampliamente estudiadas en animales de laboratorio (Gaytan *et al.* 2002), mujeres (Killick & Elstein 1987), vacas (De Silva & Reeves 1985), ovejas (Murdoch *et al.* 1986) y yeguas (Cuervo-Arango & Domingo-Ortiz 2011, Cuervo-Arango 2011). En todas estas especies, el bloqueo de la COX-2 mediante la administración de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) inhibió la ovulación en un porcentaje elevado de las hembras tratadas y se indujo la formación de folículos luteinizados anovulatorios (LUF). Estos LUF inducidos experimentalmente comparten las mismas características hormonales y ecográficas que los folículos hemorrágicos anovulatorios (HAF), la condición anovulatoria más común que sucede espontáneamente en yeguas (Ginther *et al.* 2007a, Cuervo-Arango & Newcombe 2010). Aunque los HAF regresan espontáneamente tras el periodo de diestro normal (Cuervo-Arango & Newcombe 2010) muchas yeguas tienden a repetir el síndrome en ciclos posteriores reduciendo sus posibilidades de quedar gestantes en la temporada reproductora correspondiente.

Probablemente la inexistencia de opciones terapéuticas radica en el desconocimiento de la fisiopatología de este síndrome. Algunos estudios han citado el uso de prostaglandina F2 $\alpha$ , (Ginther & Al-Mamun 2009) o su análogo sintético, cloprostenol (Cuervo-Arango & Newcombe 2010, Cuervo-Arango & Newcombe 2009a, Cuervo-Arango & Newcombe 2009b) con un aumento en la incidencia de HAF. Esto puede deberse a que la caída en la concentración de progesterona resultante de la administración de una prostaglandina exógena para lisar el cuerpo

## INTRODUCCIÓN

lúteo (CL), permite un mayor aumento de LH durante etapas tempranas del desarrollo folicular, interfiriendo con el proceso futuro de ovulación (Ginther *et al.* 2008a).

Las PG no son el único factor clave involucrado en el proceso de ovulación. Hay otros factores como el receptor de progesterona, matrix-metaloproteinasas (MMP), como la desintegrina o “metaloproteinase with thrombospondin-like motifs-1” (ADAMTS-1) (Boerboom *et al.* 2003) y la plasmina. Por ello, técnicamente, la inhibición de alguno de estos factores podría inhibir el proceso de ovulación (Russell & Robker 2007).

Estudios realizados en conejos consiguieron bloquear la ovulación mediante la perfusión del ovario con grandes concentraciones de PRL, probablemente por la reducción en la producción de plasmina en el ovario (Yoshimura *et al.* 1994). Investigaciones anteriores también demostraron que un aumento en los niveles de PRL actuaba directamente en el ovario suprimiendo el desarrollo folicular, así como, reduciendo la tasa de ovulación (Lin *et al.* 1988, Yoshimura *et al.* 1992). Una forma de elevar las concentraciones plasmáticas de PRL en la yegua, es el uso de antagonistas de la dopamina, como la sulpirida (Besognet *et al.* 1997, Donadeu & Thompson 2002).

Como se ha descrito anteriormente, la prolactina y las prostaglandinas forman parte de los mecanismos implicados en el proceso de ovulación, y la variación en sus niveles plasmáticos e intrafoliculares también se relaciona con el síndrome HAF en yeguas y, por tanto, con el fallo ovulatorio. Por ello, determinar el efecto de dichas variaciones sobre la ovulación y la fertilidad es el objetivo principal de esta tesis doctoral que permitirá ampliar conocimientos sobre la fisiología de la ovulación y valorar posibles alternativas terapéuticas para abordar el fallo ovulatorio, concretamente el síndrome HAF, en yeguas.

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

## 1. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DEL PERIODO PERIOVULATORIO

El ciclo reproductivo de la yegua comprende una época de actividad reproductora que corresponde a la primavera y verano, cuando hay más horas de luz, y otra de inactividad reproductora o anovulatoria correspondiente a los meses de invierno. Entre ambas etapas hay un periodo de transición (Ginther 1992).

En la yegua el ciclo estral tiene una duración media de 22 días, de los cuales 15 días corresponden al diestro y 7 días al estro (Aurich 2011) al final del cual tiene lugar la ovulación (Palmer 1978, Ginther 1992). El periodo periovulatorio comprende una serie de mecanismos fisiológicos cuyo objetivo final es la ovulación y el establecimiento de la gestación. Conocer estos procesos es fundamental para poder establecer un manejo reproductivo adecuado, así como entender la fisiopatología del fallo ovulatorio y sus posibles causas.

### 1.1. Endocrinología del periodo periovulatorio.

El inicio del estro en la yegua se caracteriza por la disminución de la concentración de progesterona y hormona folículo estimulante (FSH) en circulación periférica y por el incremento en la concentración de hormona luteinizante (LH) y estradiol (Ginther *et al.* 2005).

Las concentraciones plasmáticas de FSH durante el ciclo estral presentan dos ondas, una mayor durante el diestro, asociada a la onda folicular, la cual comienza a declinar cuando el folículo dominante alcanza un diámetro aproximado de 13 mm, evitando así el crecimiento de los folículos subordinados (Gastal *et al.* 1997). La otra onda de FSH es menos abrupta y coincide con la onda preovulatoria de LH, descendiendo hasta su concentración más baja cuando la LH está alcanzando su concentración máxima en circulación periférica durante el periodo periovulatorio (Irvine *et al.* 1998).

En la yegua, la onda preovulatoria de LH es larga a diferencia de otras especies. Además, las concentraciones de LH durante la onda preovulatoria tienen un incremento bifásico. El inicio en el incremento de LH comienza tras la luteolisis, aproximadamente 10 días antes de la ovulación, y dicho incremento se hace más marcado a partir de dos días antes de la ovulación alcanzándose el pico más alto un día después de ésta (Ginther *et al.* 2005). Las concentraciones de estradiol aumentan al inicio del estro de forma concomitante con la LH en la primera fase de la onda y alcanzan un pico dos días antes de la ovulación a partir del cual comienza a disminuir

debido al cambio enzimático que se produce en las células de la granulosa. Esta disminución en las concentraciones de estradiol en circulación periférica es la responsable del rápido aumento de LH, debido al feedback negativo que ejerce el estradiol sobre la LH (Ginther *et al.* 2007b, Gastal *et al.* 2006a). Este rápido aumento de LH se puede inducir mediante la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG), tras la cual la ovulación tendrá lugar entre las 36 y 42 h posteriores a su administración (Ginther *et al.* 2009). Sin embargo, algunas yeguas en las que se han empleado varios tratamientos con hCG desarrollan anticuerpos contra dicha hormona y, por tanto, no se produce el efecto sobre la concentración de LH (Siddiqui *et al.* 2009).

En yeguas, el estradiol ejerce un efecto positivo sobre la liberación de prolactina (PRL) de forma que el aumento de estradiol al inicio del estro va seguido de un aumento de PRL (Roser *et al.* 1987), y también se ha observado una disminución en la concentración plasmática de PRL en las horas previas a la ovulación (Bashir *et al.* 2016), así como sucede con la concentración plasmática de estradiol. Otros estudios confirmaron el efecto del estradiol sobre la PRL mediante la administración de estradiol durante 21 días a yeguas poni ovariectomizadas observando un aumento en la concentración de PRL en plasma, así como en la glándula pituitaria (Thompson *et al.* 1991).

En cuanto a la concentración plasmática de progesterona, ésta desciende tras la luteolisis y permanece por debajo de 1 ng/mL durante el estro (Ginther *et al.* 2006a).

### **1.2. Edema endometrial**

La valoración del edema endometrial junto con los cambios en el folículo preovulatorio son buenos indicadores para predecir el momento de la ovulación. El incremento del edema comienza entre los 7 y 8 días previos a la ovulación, alcanza el valor máximo el día 3 antes de la ovulación y los 2 días previos a la ovulación comienza a disminuir (Hayes *et al.* 1985). El patrón de edema endometrial durante el estro se ha correlacionado de forma positiva con la concentración en circulación periférica de estradiol (Gastal *et al.* 2006a).

### **1.3. Cambios en el folículo preovulatorio**

El tamaño del folículo preovulatorio es variable, con un rango entre 34 y 70 mm (Ginther 1995) dependiendo de varios factores. Razas pesadas ovulan con tamaños foliculares mayores que razas más ligeras (Ginther 1995). Cuando se producen ovulaciones dobles, los dos folículos preovulatorios alcanzan diámetros menores que cuando se producen ovulaciones simples (Ginther & Pierson 1989). Además la época del año es otro factor a tener en cuenta, ya que en



los primeros meses de la temporada reproductora (abril y mayo) los diámetros del folículo preovulatorio 1 día antes de la ovulación son mayores que en los meses del verano (Ginther & Pierson 1989). Por todo ello, predecir el momento de la ovulación, empleando sólo el diámetro folicular puede inducir a error. Por otro lado, hay cierta repetitividad dentro de un mismo individuo en cuanto al tamaño del folículo preovulatorio en sucesivos ciclos (Cuervo-Arango & Newcombe 2008) de forma que, conociendo los diámetros foliculares de una yegua en sus ciclos anteriores se podría estimar el tamaño aproximado con el que ovularía, teniendo en cuenta otros factores que se detallan a continuación.

Desde que se produce la desviación folicular, el folículo preovulatorio crece alrededor de 3 mm por día (Ginther *et al.* 2008b). Este crecimiento cesa dos días antes de que se produzca la ovulación (Gastal *et al.* 2006a, Koskinen *et al.* 1989). En las yeguas en las que se induce la ovulación mediante la administración de hCG, el ritmo de crecimiento folicular disminuye de forma gradual y, por tanto, el folículo ovula con un diámetro similar al que tenía en el momento de la administración de la hCG (Gastal *et al.* 2006a).

La forma del folículo preovulatorio es esférica y adquiere una forma cónica 24 h antes de la ovulación en el 84-89 % de las yeguas (Pierson & Ginther 1985a, Koskinen *et al.* 1989), siendo este porcentaje menor (50 %) en otros estudios (Gastal *et al.* 2006b). La turgencia del folículo comienza a disminuir 1 día antes de la ovulación y es una característica bastante constante a partir de las 8 h previas a la ovulación (Gastal *et al.* 2006b).

La pared del folículo está formada por varias capas: la capa que está en contacto con el líquido folicular corresponde a las células de la granulosa y más externamente se sitúan las células de la teca (interna y externa). Ecográficamente, la capa que corresponde a las células de la granulosa es ecogénica y su grosor y ecogenicidad aumenta 24 h antes de la ovulación (Ginther *et al.* 2005, Gastal *et al.* 2006a). Otra característica que se puede detectar ecográficamente antes de la ovulación, es la presencia de una banda anecoica entre la capa de la granulosa y la teca cuya prominencia aumenta progresivamente entre 3 y 1 día antes de la ovulación (Gastal *et al.* 1998). La capa de la granulosa, además, puede adoptar una forma irregular que se denomina serrada cuando se acerca la ovulación, y es más evidente en la zona opuesta al ápex del folículo (Ginther *et al.* 2007c). En un estudio realizado con 27 yeguas se observó la granulosa serrada en un 59% de yeguas entre las 12 y 1 h antes de la ovulación, siendo este porcentaje menor entre las 24 y 13 h previas a la ovulación (Gastal *et al.* 2006b).

#### 1.4. Proceso de ruptura folicular

En la yegua, la enzima COX-2, se expresa en las células de la granulosa 30 h después del comienzo de la parte final de la onda preovulatoria de LH, tanto si ésta se produce de forma fisiológica como si es inducida con la administración de hCG. La COX-2 es la enzima limitante que cataliza la reacción de biosíntesis de prostanoídes a partir de ácido araquidónico (Sirois & Dore 1997). Las PG son clave en el proceso de ovulación de numerosas especies (Robker *et al.* 2000a). Se cree que su implicación en el proceso de ruptura folicular es a través de la activación de una familia de proteasas denominadas metaloproteinasas de la matriz (MMP) y activadores del plasminógeno (Markosyan & Duffy 2009, Li *et al.* 2006). Las MMP junto con otras enzimas proteolíticas, producen una amplia remodelación en el ápex del folículo que culmina con la ruptura de la pared y la ovulación. La síntesis de las enzimas proteolíticas puede ser dependiente o independiente de las PG, como se observó en un estudio realizado en vacas (Li *et al.* 2009).

Otro de los mediadores implicados en el proceso de ruptura folicular y liberación del ovocito es el receptor de progesterona (PR) (Akison & Robker 2012, Robker *et al.* 2009). Ratones modificados genéticamente en los que se suprimió la expresión del PR, presentaron fallo ovulatorio (Lydon *et al.* 1995); así como defectos en la expresión de ciertas enzimas proteasas, como la ADAMTS-1 o la catepsina L (Robker *et al.* 2000b).

#### 1.5. Liberación y maduración del ovocito

Tras la ruptura de la pared folicular se produce el colapso repentino del folículo debido a la evacuación de aproximadamente el 95 % del fluido folicular (Townson & Ginther 1987) en pocos minutos. Junto con el fluido folicular se libera el ovocito maduro el cual permanecerá en el oviducto hasta 6 días después, para entrar posteriormente en el útero, en el caso de que haya sido fecundado o permanecer en el oviducto si no ha sido fecundado (Ginther 1992). El ovocito liberado es un ovocito secundario en metafase II, es decir, que ha reducido su número de cromosomas de 64 (2N) a 32 (1N) y se encuentra en un estado de arresto durante la segunda división meiótica (King *et al.* 1987). La fertilización se produce cuando el espermatozoide penetra al óvulo y es entonces cuando la división meiótica se reanuda (Ginther 1992). Hormonalmente, es la onda preovulatoria de LH la que estimula la maduración del ovocito primario para continuar la división y convertirse en un ovocito secundario. Por ello, para la recolección de ovocitos maduros en reproducción asistida se emplea la hCG de forma que, los ovocitos recogidos 35 h tras la administración de hCG se encuentran en metafase II mientras que los que se recogen a las 24 h están en metafase I (Hinrichs 2013).

Otra función de la LH es favorecer la expansión del complejo *cumulus-oophorus* y permitir que el ovocito se desprenda de la capa de células de la granulosa de la pared del folículo preovulatorio (Hinrichs *et al.* 1990).

### **1.6. Inicio de la fase lútea**

Tras el colapso folicular el inicio de la fase lútea se caracteriza por el aumento en la concentración plasmática de progesterona por encima de 1 ng/mL, siendo dicho aumento significativo entre las 12 y 24 h posteriores (0.5 vs 1.1 ng/mL) (Townson *et al.* 1989).

Ecográficamente se pueden distinguir dos morfologías diferentes de CL: una morfología sólida, uniformemente ecogénica y una morfología que presenta una laguna en el interior correspondiente a un coágulo de sangre y que se denomina cuerpo hemorrágico (CH). En los dos tipos de CL no hay diferencias en cuanto a la producción de progesterona (Townson *et al.* 1989) o duración del diestro (Pierson & Ginther 1985b).

## **2. FALLO OVULATORIO: FOLÍCULOS HEMORRÁGICOS ANOVULATORIOS**

El fallo ovulatorio durante la época reproductora de la yegua es una condición que se considera patológica. Los folículos hemorrágicos anovulatorios (HAF) son la patología anovulatoria más común que ocurre de forma natural en la yegua (Ginther *et al.* 2007a, Cuervo-Arango & Newcombe 2009a). Aunque la incidencia total de esta condición anovulatoria en la población de yeguas es baja, de un 5 a un 8 % de todos los ciclos estrales (McCue & Squires 2002, Cuervo-Arango & Newcombe 2009a, Ginther & Pierson 1989), esta condición puede alcanzar incidencias del 25 al 50 % del total de ciclos en ciertas yeguas, a las que se les suele denominar “yeguas repetidoras” (Cuervo-Arango & Newcombe 2009a, Cuervo-Arango & Newcombe 2009b). Los primeros indicios en la bibliografía que hacen referencia a estos folículos “que no se rompen” fueron por los años 40 (Burkhardt 1948). Se observó que en los meses de octubre a noviembre se daba este fenómeno. En trabajos posteriores se los nombró como folículos de otoño (Knudsen & Velle 1961) y se describió la presencia de líquido hemorrágico en el antro folicular (Ginther 1979). La terminología más aceptada que se ha empleado en estudios más recientes y la que se va a utilizar en los siguientes apartados es la de HAF, cuando éstos se producen de forma espontánea. La principal característica de los HAF es que no se colapsan, sino que forman un hematoma en el interior del antro folicular y, por lo tanto, el ovocito no puede ser liberado.

También en la mujer podemos encontrar un síndrome con las mismas características denominándose folículos luteinizados anovulatorios, cuyas siglas en inglés son: LUF (Qublan *et al.* 2006, Marik & Hulka 1978, LeMaire 1987).

### **2.1. Características ecográficas de los folículos hemorrágicos anovulatorios.**

Las características ecográficas de los HAF varían según su fase de desarrollo. En los estadios iniciales, tanto el diámetro como el contenido anecoico del antro folicular son exactamente igual que un folículo preovulatorio que culminará en una ovulación normal (Ginther *et al.* 2006b). Sin embargo se ha determinado ecográficamente, mediante el modo power-Doppler, un aumento de flujo sanguíneo en el área apical de la pared de los folículos que van a formar HAF unas horas previas a su formación, en comparación con folículos que ovulan normalmente (Ginther *et al.* 2006b, Ginther *et al.* 2011). Este aumento de la vascularización también se ha observado en folículos que ovulan mediante un colapso o evacuación formando compartimentos o septos (Ginther *et al.* 2007c), por tanto los HAF y las ovulaciones en las que se forman septos compartirían dicha característica.

El primer hallazgo ecográfico indicativo de la formación de un HAF es la presencia de partículas ecogénicas flotando libremente en el antro folicular, apreciable al agitar el ovario varias veces consecutivas durante la ecografía. La presencia de estas partículas en el antro folicular indica el inicio de la hemorragia, y se considera equivalente a las 12 h tras la ovulación si lo comparamos con yeguas que ovulan normalmente (Cuervo-Arango *et al.* 2011). Posteriormente, el número de partículas aumenta hasta que resulta difícil contarlas, pero se siguen moviendo libremente en el antro folicular tras el movimiento del ovario. El siguiente hallazgo es la presencia de coágulos o bandas de fibrina, de apariencia más ecogénica, y tras mover el ovario se puede apreciar cómo las abundantes partículas se mueven como si, en sentido figurado, nevara. Una vez el contenido se ha coagulado, puede presentar 3 morfologías diferentes (Cuervo-Arango & Newcombe 2012):

- Contenido sólido, una masa de tejido anecoico homogéneo que permanece firme durante el movimiento del ovario.
- Apariencia “en tela de araña”, se refiere a un contenido organizado formando un entramado de bandas de fibrina que inicialmente se mueven como una gelatina y después se convierte en una estructura firme.
- Apariencia mixta. Se trata de folículos que presentan ambas apariencias en el interior del antro folicular, una masa anecoica adyacente a una cavidad con bandas de fibrina o partículas moviéndose libremente. La cavidad puede ser central o periférica.

Estudios recientes compararon características ecográficas de CL y HAF, viendo diferencias en el grosor de la pared luteal, siendo mayor en los cuerpos hemorrágicos de CL que en los HAF (Cuervo-Arango & Newcombe 2013).

El diámetro máximo que pueden alcanzar los HAF es variable según estudios pero el rango aproximado es de 60 a 80 mm y corresponde al tercer día desde la detección del inicio de la hemorragia (Ginther *et al.* 2006b, Cuervo-Arango & Newcombe 2012, Cuervo-Arango & Newcombe 2013).

## **2.2. Características hormonales durante el periodo periovulatorio en yeguas con folículos hemorrágicos anovulatorios.**

Los estudios realizados hasta la fecha no han revelado diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de FSH, LH y progesterona entre yeguas que desarrollan HAF y las que ovulan normalmente en los días previos a la formación del HAF/ovulación. Estudios realizados por Ginther y colaboradores en el 2007 mostraron concentraciones plasmáticas de estradiol en el periodo periovulatorio mayores en el grupo de yeguas que desarrollaron HAF, 3 días antes de su formación. En el mismo estudio, se observó un aumento significativo en la concentración plasmática de LH en yeguas que formaron HAF en los días 3, 4 y 5 tras su formación; así como, una concentración plasmática de progesterona menor en el día 3 tras la formación del HAF, en comparación con las yeguas control (Ginther *et al.* 2007a). En un estudio en el que se analizaron 42 yeguas con HAF, se midió la concentración plasmática de progesterona desde el día en el que se detectó el inicio de la hemorragia hasta la siguiente ovulación, el 85 % de las yeguas mostraron concentraciones plasmáticas de progesterona por encima de 1 ng/ mL (McCue & Squires 2002). Los niveles plasmáticos de progesterona comienzan a elevarse a las 24-48 h del inicio de la formación del HAF y se incrementan en los siguientes días hasta superar los 10 ng/ mL (McCue & McKinnon 2011). En otro estudio en el que se valoraba el momento óptimo de administración de FM para inducir LUF, también se realizó la medición de progesterona plasmática en los días 0, 5 y 9 tras la formación de LUF. Las concentraciones de progesterona fueron significativamente menores los días 5 y 9, en los grupos con mayor incidencia de LUF en comparación con el grupo control y los grupos en los que se produjeron ovulaciones (Cuervo-Arango 2011). En este estudio se postuló que una posible explicación a las concentraciones más bajas de progesterona en las yeguas que desarrollaron LUF, fue que la ausencia del colapso folicular pudiera haber afectado a la productividad de las células luteales; ya que, cuando se empieza a formar el tejido luteal, tras una ovulación normal,

se produce una proliferación de capilares que aportan nutrientes necesarios para las células de la granulosa y su desarrollo posterior.

### **2.3. Impacto sobre la fertilidad de la yegua.**

La principal característica de los HAF es que no se colapsan y, por tanto, el ovocito no puede ser liberado quedando retenido en el coágulo que se forma en el antro folicular. Por ello, las yeguas que presentan folículos hemorrágicos no son fértiles en ese ciclo concreto.

La problemática de los HAF en la reproducción equina radica en la similitud del folículo preovulatorio, que ovulará normalmente, y el folículo que formará un HAF. Si una yegua ha sido inseminada o se ha realizado monta natural, y desarrolla un HAF en ese ciclo, no quedará gestante. En un estudio realizado sobre 71 yeguas que presentaban folículos persistentes que no ovularon demostraron que, tras ser inseminadas, ninguna de ellas quedó gestante (McCue & Squires 2002). La única posibilidad de gestación se daría si hubiera otro folículo, en ese ciclo, que ovulara normalmente. En yeguas “repetidoras” no es infrecuente encontrar ciclos con uno o más HAF acompañado de una o más ovulaciones en el mismo estro (Cuervo-Arango & Newcombe 2009b).

La incidencia de HAF en la temporada reproductora es del 5-8 % (Ginther & Pierson 1989, McCue & Squires 2002). En estudios posteriores, se observó una mayor incidencia aproximadamente del 20 % en los meses de octubre y noviembre, al final de la temporada reproductora (Ginther *et al.* 2007a). Este aumento en la incidencia de HAF en otoño se ha postulado que podría deberse a que las yeguas fértiles quedan gestantes al inicio de la temporada y las yeguas problemáticas se dejan para el final, por tanto, se observa en mayor medida en otoño.

Aunque el impacto total sobre la fertilidad de la yegua es bajo en base a la incidencia de la patología en el total de ciclos estrales; el impacto sobre un individuo puede ser mucho mayor debido a que las yeguas que tienden a desarrollar estos folículos de forma frecuente, pueden alcanzar hasta un 50 % de repetitividad en los ciclos siguientes (Ginther *et al.* 2007a), como se ha mencionado anteriormente.

### **2.4. Factores de riesgo**

Entre los principales factores de riesgo en el desarrollo de folículos hemorrágicos, se encuentra el uso de tratamientos inductores del estro, como la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (Ginther *et al.* 2008b) y sus análogos sintéticos (PGF) (Cuervo-Arango & Newcombe 2009a, Cuervo-Arango & Newcombe 2010). En un estudio realizado con 42 yeguas que presentaban HAF, el 23 % de las

yeguas en las que se administró PGF2 $\alpha$  (26/42) desarrollaron nuevamente un HAF en el siguiente ciclo (McCue & Squires 2002). El uso de PGF2 $\alpha$  o sus análogos sintéticos, induce la elevación en la concentración plasmática de LH de forma directa, estimulando su liberación (Jochle *et al.* 1987); y de forma indirecta, debido a la bajada de progesterona que se produce tras la luteolisis (Gastal *et al.* 2000, Gastal *et al.* 1999). La hipótesis que se ha postulado en varios estudios es que, el aumento en la incidencia de HAF tras el tratamiento con PGF2 $\alpha$  podría deberse al aumento de LH en fases tempranas del desarrollo folicular, pudiendo interferir en la síntesis de los prostanoideos implicados en el proceso de ovulación (Ginther *et al.* 2008a, Ginther *et al.* 2008c). En esta línea, estudios con modelos de roedores transgénicos consiguieron una secreción anormal de LH en los ratones modificados genéticamente, observándose además en dichos roedores, problemas de infertilidad, ovarios poliquísticos con contenido hemorrágico, tumores ováricos y problemas renales (Risma *et al.* 1995). En mujeres también se han relacionado los niveles elevados de LH en la fase folicular con el síndrome del ovario poliquístico e infertilidad (Regan *et al.* 1990). Sin embargo, en yeguas, estudios en los que se administró LH durante la fase de desarrollo folicular no consiguieron demostrar ninguna relación entre el incremento de la concentración periférica de LH y un aumento del fallo ovulatorio (Schauer *et al.* 2013). En mujeres que padecían síndrome LUF, las concentraciones de LH fueron similares a las controles, durante todo el ciclo, aunque se observó una menor concentración de receptores de LH en las células luteales de los LUF (Koskimies *et al.* 1987). Los receptores de LH en las células de la granulosa aumentan durante el ciclo de una forma bifásica, primero durante la maduración folicular y, posteriormente, durante la luteinización (Rajaniemi *et al.* 1981).

Otro de los tratamientos empleados para inducir ovulación, la hCG, también fue motivo de estudio como posible factor de riesgo (Cuervo-Arango & Newcombe 2009a), pero no se hallaron diferencias significativas entre los grupos tratados con hCG y la incidencia de HAF. En el estudio, que se ha mencionado anteriormente, en el que se analizaron varios parámetros en 42 yeguas con HAF, se observó que, en el 52 % de las yeguas se habían empleado inductores de la ovulación (hCG o GnRH) (McCue & Squires 2002).

En varios estudios, se cita la edad como factor de riesgo, de manera que la incidencia de HAF es mayor en yeguas de más de 20 años de edad (Ginther *et al.* 2007a).

En un estudio retrospectivo en el que se analizaron 612 ciclos estrales de 7 yeguas se observó una mayor incidencia de ovulación múltiple en las yeguas que desarrollaron HAF (Cuervo-Arango & Newcombe 2010).

Otro posible factor de riesgo son las concentraciones plasmáticas de eCG, ya que en yeguas gestantes a partir del día 40 de gestación la secreción eCG se relaciona con la formación

de CL suplementarios y éstos pueden originarse a partir de folículos que ovulan (CL secundario) o a partir de HAF (CL accesorio) (Ginther 1992). En yeguas que abortan entre 70 y 100 días de gestación, se han observado ciclos anovulatorios de 40 a 50 días, periodo en el que los niveles de eCG todavía son elevados (Squires *et al.* 1980). Sin embargo, yeguas que abortan en el día 42 tienen ciclos estrales regulares tras el aborto (Rathwell *et al.* 1987).

## **2.5. Opciones de tratamiento**

En la actualidad no existe un tratamiento como tal para los HAF. Las opciones que se dan para las yeguas que desarrollan el problema es esperar al siguiente ciclo, evitando inducir la luteolisis mediante el uso de análogos de prostaglandina F2 $\alpha$ , ya que se ha demostrado que es un factor de riesgo (Cuervo-Arango & Newcombe 2010). Se podrían realizar técnicas de reproducción asistida, como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), que requiere un tratamiento en laboratorios especializados, tras previa obtención del ovocito mediante punción transvaginal ecoguiada del folículo preovulatorio y aspirado del líquido folicular (Galli *et al.* 2014) antes de que se produjera la hemorragia intrafolicular.

## **2.6. Inducción experimental de folículos hemorrágicos anovulatorios: folículos luteinizados anovulatorios.**

El lento avance en el conocimiento de la fisiopatología y las opciones terapéuticas de esta condición anovulatoria está limitado por la dificultad que requiere predecir el desarrollo de HAF, y también debido a la baja incidencia en la población de yeguas, 4-5 %. Recientemente se ha desarrollado un protocolo experimental para inducir el desarrollo de folículos luteinizados anovulatorios en yeguas (Cuervo-Arango & Domingo-Ortiz 2011). Dichos folículos comparten las mismas características ecográficas y clínicas que los HAF (Cuervo-Arango & Newcombe 2012).

El protocolo experimental para inducir LUF en yeguas fue adaptado de trabajos previos realizados en medicina humana (Killick & Elstein 1987) e implica el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) durante el periodo periovulatorio. El uso de este protocolo en yeguas, con unos porcentajes de éxito de un 70-80 %, indica que el síndrome LUF en mujeres, importante causa de infertilidad en medicina humana (Katz 1988, Qublan *et al.* 2006), podría estar ligado a los HAF producidos en yeguas.

El hecho de que la inhibición de PG de forma exógena mediante la administración de sus inhibidores (AINEs) produzca una alta incidencia de desarrollo de LUF aporta nueva información sobre el posible mecanismo patológico: la implicación de la COX-2 y sus productos (PGF2 $\alpha$  y PGE2) en el proceso de ovulación. El AINE que se empleó en los estudios citados anteriormente



en yeguas (Cuervo-Arango & Domingo-Ortiz 2011, Cuervo-Arango & Newcombe 2012) fue el flunixin meglumine, un potente inhibidor de la COX-2 (Toutain *et al.* 1994). Al producirse la inhibición en la formación de PG, aparentemente se interrumpe la cascada de eventos que conduce a la digestión de la pared folicular y finalmente a la ruptura del folículo y, por tanto, la ovulación no se produce. En mujeres que estaban bajo tratamiento con AINEs por diferentes patologías, y que estaban siendo investigadas por un problema de infertilidad durante 2 años; después de descartar otras posibles causas de infertilidad, se decidió finalizar el tratamiento con AINEs, y todas ellas quedaron gestantes en los dos meses siguientes (Akil *et al.* 1996, Stone *et al.* 2002).

Una parte importante del protocolo experimental para inducir LUF es la pauta de administración del flunixin meglumine así como el uso de hCG para inducir la onda preovulatoria de LH. Para que el protocolo sea efectivo y bloquee la ovulación, la primera dosis de flunixin se debe administrar a las 24 h tras la hCG o antes, y continuar con la pauta cada 12 h hasta las 36 h como mínimo (Cuervo-Arango 2011).

### **3. PAPEL DE LA PROLACTINA EN REPRODUCCIÓN**

La prolactina es una hormona polipeptídica sintetizada y secretada por las células lactotropas fundamentalmente en la adenohipófisis. Los efectos biológicos de la PRL son muy numerosos y se pueden encontrar sus receptores en un gran número de órganos periféricos (Freeman *et al.* 2000). En esta revisión bibliográfica sólo se tendrán en cuenta los efectos en el sistema reproductor de la yegua.

#### **3.1. Patrón de liberación durante el ciclo reproductivo de la yegua**

Las concentraciones séricas de PRL son mayores en verano y más bajas en invierno en la mayoría de mamíferos, incluidas las yeguas (Thompson *et al.* 1986, Johnson 1986). Es decir, que en la temporada reproductora las concentraciones de PRL son más elevadas.

Uno de los principales inhibidores de la producción de prolactina en la hipófisis es la dopamina (Johnson & Becker 1987). Las concentraciones de dopamina en líquido cefalorraquídeo son mayores durante el periodo anovulatorio en comparación con la temporada reproductora (Melrose *et al.* 1990), al contrario que sucede con las concentraciones plasmáticas de prolactina.

Durante el ciclo estral, hay estudios en los que no se observaron cambios en las concentraciones séricas de PRL (Johnson 1986) y otros que afirmaron que las concentraciones de PRL aumentan justo antes del inicio del estro, siendo dicho aumento más marcado en otoño y menos evidente en primavera y verano (Worthy *et al.* 1987). Además, estudios realizados por Ginther y colaboradores relacionaron un aumento en la concentración del metabolito de PGF2 $\alpha$  (PGFM) con un incremento en la concentración de PRL en el periodo en el que se produce la luteolisis, siendo este aumento más marcado en el periodo luteolítico y post-luteolítico (Ginther *et al.* 2012a). Esta asociación positiva es debida a un efecto de PGF2 $\alpha$  sobre la PRL y no al revés, como se demostró en otro estudio en el que se indujo la disminución de PGF2 $\alpha$  o PRL mediante la administración de flunixin meglumine o bromocriptina, respectivamente, para ver como afectaba dicha disminución en la asociación temporal de dichas hormonas (Ginther *et al.* 2012b).

En yeguas gestantes la concentración de PRL es más elevada durante la semana antes del parto (Roser *et al.* 1989, Worthy *et al.* 1986). No se ha determinado si las concentraciones elevadas de PRL en las yeguas post parto podría tener relación con los ciclos irregulares observados durante las semanas posteriores al parto.

### **3.2. Estimulación de la secreción de prolactina mediante el uso de antagonistas de la dopamina**

Los antagonistas de la dopamina se emplean en reproducción equina con el objetivo de estimular la secreción de prolactina con diversos fines. Hay diferentes tipos de antagonistas en función del tipo de receptor al que se unen. Los más empleados en caballos son la sulpirida (Donadeu & Thompson 2002, Mari *et al.* 2009, Korosue *et al.* 2012, Panzani *et al.* 2011, Besognet *et al.* 1997), cuya acción se centra sobre los receptores post-sinápticos D2 de la dopamina, y la domperidona (Mari *et al.* 2009, Brendemuehl & Cross 2000), que actúa sobre los receptores D2 y D3. La sulpirida, administrada oralmente, tiene una biodisponibilidad baja (20%) y se absorbe lentamente, sin embargo, cuando la administración es vía intramuscular (IM) o intravenosa (IV), la biodisponibilidad es mayor (100 %) y la vida media es de 7 h (Giorgi *et al.* 2013).

#### **3.2.1. Inducción de la lactación**

Uno de los objetivos de inducir la lactación en yeguas que no han parido recientemente es poder alimentar a potros que, por cualquier circunstancia, han sido separados de su madre. También está indicado como tratamiento de la agalactia producida por la ingestión accidental de

hierba o cereal infectado con un hongo endófito *Neotyphodium coenophialum*, ya que dicha toxicosis tiene, entre otros efectos, la reducción en la secreción de PRL (McCann *et al.* 1992).

Además de la prolactina, las hormonas esteroideas producidas en el ovario son necesarias para la producción láctea. En estudios realizados para inducir lactación en yeguas no gestantes se administraron tratamientos hormonales con estradiol y progesterona además de sulpirida (Korosue *et al.* 2012, Chavatte-Palmer *et al.* 2002). Sin embargo, estudios realizados en yeguas ovariectomizadas y yeguas intactas demostraron que la administración de sulpirida en yeguas intactas inducía el aumento de las concentraciones de PRL y la lactación, sin necesidad de administrar tratamiento hormonal; el mismo tratamiento en yeguas ovariectomizadas, pese a aumentar las concentraciones de PRL, no consiguió inducir la producción de leche (Guillaume *et al.* 2003).

### 3.2.2. Adelantar la primera ovulación de la temporada reproductora.

En la cría de caballos de carreras, sobretodo carreras de velocidad en las que se comienza a competir con edades muy tempranas (pura sangre inglés), es importante que los potros nazcan al inicio del año para poder ser atléticamente mayores con respecto a los nacidos más tarde pero que competirán en el mismo rango de edades. Para ello, las cubriciones de las yeguas deberían realizarse al inicio de la temporada reproductora y, en el caso del hemisferio norte, estas fechas corresponden al mes de febrero. El uso de antagonistas de la dopamina para adelantar la primera ovulación en yeguas en fase anovulatoria o en transición primaveral ha tenido resultados variables según estudios. La sulpirida es el antagonista de la dopamina más utilizado para adelantar la primera ovulación de la temporada. En un estudio en el que se comparó la eficacia de la sulpirida y la domperidona, las yeguas tratadas con sulpirida ovularon  $36 \pm 0.8$  días tras comenzar el tratamiento y las tratadas con domperidona ovularon a los  $74.7 \pm 3.3$  días (Mari *et al.* 2009). Besognet y col. consiguieron adelantar la primera ovulación tras la administración de sulpirida diaria intramuscular durante al menos 22 días, en yeguas en anestro. En este estudio la LH y FSH fueron más altas en el grupo tratamiento en el momento de la primera ovulación (Besognet *et al.* 1997). Con un protocolo diferente Panzani y col. también consiguieron adelantar la primera ovulación de la temporada (Panzani *et al.* 2011). Sin embargo, Donadeu y Thompson tras la administración diaria de sulpirida durante un mes, no consiguieron ningún efecto sobre la ovulación ni la secreción de gonadotropinas aunque la concentración plasmática de PRL sí que aumentó (Donadeu & Thompson 2002). En otros experimentos se consiguió adelantar 4 semanas la primera ovulación de la temporada, pero en este caso se administró PRL recombinante porcina durante 45 días (Thompson *et al.* 1997). La discrepancia

entre los diferentes resultados puede deberse a las diferentes dosis y protocolos de administración empleados en cada experimento.

### **3.3. Efecto de la hiperprolactinemia sobre la ovulación**

Uno de los objetivos del uso de antagonistas de la dopamina es el estudio de los efectos de la PRL sobre la ovulación y los niveles de gonadotropinas y de hormonas esteroideas, en diversas especies: conejos (Lin *et al.* 1987, Lin *et al.* 1988) y ratas (Ota *et al.* 1986). La administración de sulpirida supone un aumento en la secreción de PRL, la cual podría ejercer su efecto sobre las gonadotropinas circulantes (Cohen-Becker *et al.* 1986a, Cohen-Becker *et al.* 1986b), a nivel ovárico aumentando el número de receptores de LH y/o FSH, como se ha demostrado en otras especies como la rata (Advis & Ojeda 1978) o sobre los receptores de PRL, como se ha observado en el hámster macho a nivel testicular (Klemcke *et al.* 1984). Otros estudios, realizados en yeguas, no obtuvieron cambios significativos en cuanto a la concentración de FSH y LH tras la administración de sulpirida, sin embargo la concentración de PRL se mantuvo elevada sólo durante las primeras horas tras la administración (Donadeu & Thompson 2002). La dosis de sulpirida que se empleó en el estudio citado anteriormente fue baja en comparación con otros estudios (Pinaffi *et al.* 2012). Tampoco se obtuvieron diferencias sobre la concentración de LH, ni sobre la ovulación en otro estudio realizado en yeguas, aunque en este caso se indujo hiperprolactinemia mediante la administración de metoclopramida otro antagonista de la dopamina, durante 4 días comenzando el día 17 del ciclo, siendo el día 0 el día de la ovulación del ciclo anterior (Becker & Johnson 1990).

En otras especies, como en conejos, sí que consiguieron bloquear la ovulación mediante la perfusión del ovario con grandes concentraciones de PRL, probablemente por una disminución en la producción de plasmina en el ovario (Yoshimura *et al.* 1994). Dicha reducción se consiguió inhibiendo la función del activador del plasminógeno (PA) que es necesario para la síntesis de plasmina a partir de plasminógeno. La plasmina es una proteasa que, junto a otras enzimas, activa las colagenasas que degradan el tejido conectivo de la pared folicular. Investigaciones anteriores indican que un aumento en los niveles de PRL actúa directamente en el ovario reduciendo la tasa de ovulación (Yoshimura *et al.* 1992, Lin *et al.* 1988). Sin embargo, en esta serie de experimentos no se observó una luteinización de los folículos anovulatorios como en el caso de estudios sobre la inhibición de la producción de PG intrafoliculares.

En mujeres, la hiperprolactinemia, al parecer, induce amenorrea por inhibición de la liberación de gonadotropinas e inhibición del crecimiento folicular más que por el bloqueo del proceso de degradación de la pared del folículo preovulatorio (Evans *et al.* 1982, Molitch 2010).

En yeguas, se indujo experimentalmente hiperprolactinemia consiguiendo bloquear la ovulación en un porcentaje significativo de yeguas (Zagrajczuk & Okolski 2010), aunque esta comunicación (abstract) no aportó datos ecográficos ni clínicos de LUF.

El efecto de estos fármacos durante el periodo periovulatorio en yeguas cíclicas necesita más estudios. Por ello, en la presente tesis doctoral una de las fases experimentales tiene como objetivo determinar el efecto de la PRL sobre la ovulación/anovulación en yeguas cíclicas.

#### **4. TÉCNICAS DE PUNCIÓN FOLICULAR EN YEGUAS**

Las técnicas de punción folicular se emplean fundamentalmente en investigación para la ablación folicular y sincronización de una nueva oleada folicular, obtención de células de la granulosa y líquido folicular, así como, para la administración de sustancias de forma local dentro del folículo. La técnica varía en función del objetivo de cada estudio. En reproducción asistida también se emplean estas técnicas para obtener los ovocitos; en este campo la técnica elegida depende de si se obtienen ovocitos inmaduros de todos los folículos del ovario o se quiere obtener el ovocito maduro del folículo preovulatorio dominante (Hinrichs 2013).

##### **4.1. Punción del folículo a través del flanco**

Esta técnica es la empleada en reproducción asistida para aspirar líquido folicular y así obtener ovocitos maduros a partir del folículo preovulatorio dominante previamente estimulado con hCG. Las tasas de recolección suelen ser elevadas con esta técnica (65-80%) ya que la adherencia del ovocito y del complejo *cumulus-oophorus* a la pared del folículo es baja (Hinrichs *et al.* 1990).

Para realizar la punción, el ovario puede ser manipulado a través del recto (Hinrichs *et al.* 1991) o directamente a través de la cavidad abdominal mediante una incisión en la vagina (colpotomía) (Hinrichs *et al.* 1990). Cuando se manipula a través del recto el procedimiento debe ser rápido, puesto que el peristaltismo intestinal puede hacer que se mueva la aguja y salga de la cavidad folicular, es por ello, que realizar el lavado del folículo varias veces no sería adecuado. Realizar el procedimiento con ayuda de una incisión en la vagina permite una mayor sujeción y el lavado del folículo es más seguro; además, con este método, se obtuvieron mejores tasas de

recuperación de ovocitos en comparación con la manipulación a través del recto (Hinrichs *et al.* 1990).

La preparación del animal para esta técnica consta de una sedación y administración de anestesia local en la zona del flanco, previamente desinfectada. La forma de acceso a través del flanco es mediante un trocar con cánula a través de la cual se introduce una aguja de 14 G y 20 cm de longitud. Esta aguja puede ir unida a una extensión tubular de teflón al final de la cual se conecta una jeringa de 60 cc o puede ir conectada a una bomba de vacío.

Una vez se introduce la aguja en el folículo se procede a la aspiración del líquido folicular. Si se realiza lavado del folículo, se masajea suavemente después de la aspiración del contenido folicular con el objetivo de separar el ovocito de la pared folicular y se administra una solución para realizar el lavado.

Aunque la técnica a través de la colpotomía tiene ciertas ventajas en cuanto a la manipulación directa del ovario, también es más invasiva. Entre las posibles complicaciones podemos encontrar: punción de órganos abdominales, peritonitis o evisceración a través de la incisión.

Por otro lado, la manipulación del ovario a través del recto tiene también riesgos como la punción del recto con la aguja y laceraciones rectales por la manipulación. Para minimizar el riesgo de laceraciones, se pueden emplear relajantes de la musculatura del recto como el butilbromuro de escopolamina (Luo *et al.* 2006).

### **4.2. Punción transvaginal ecoguiada**

Esta técnica es empleada también para recolección de ovocitos en reproducción asistida, además, se emplea en investigación para realizar la ablación de folículos con fines diversos (Gastal *et al.* 1997) y para la toma de muestras de líquido folicular para valorar la concentración de hormonas (Donadeu & Ginther 2002) o de células de la granulosa para analizar la expresión génica, así como para la administración de sustancias exógenas en el antro folicular.

Para la realización de esta técnica se requiere un material específico que incluye, además del ecógrafo, una sonda transvaginal y agujas específicas que se introducen en una guía incorporada en la sonda. En el caso de aspiración del folículo, ya sea para toma de muestra de líquido folicular, recolección de ovocitos, o simplemente para vaciar el contenido del folículo, se emplean agujas de calibre 16 G (Mozzaquatro *et al.* 2010), o 17 G (Doyle *et al.* 2008, Schauer *et al.* 2011, Schauer *et al.* 2013) y 55 cm de longitud. Para realizar el aspirado se puede emplear un tubo de silicona conectado desde la aguja hasta una jeringa de 60 cc o a un sistema de

aspiración mediante una bomba de vacío. Puesto que el objetivo de estas técnicas es aspirar todo el contenido del folículo, el hecho de que se empleen agujas de gran calibre no es un riesgo para la pérdida de líquido folicular por el orificio de entrada de la aguja. Esto, sí que podría suponer un problema en el caso de que el objetivo de realizar la técnica fuera la inyección de fármacos dentro del folículo porque podría haber pérdidas de líquido folicular por el orificio de entrada de la aguja, y por tanto, perderse además parte del fármaco administrado. Por otro lado, una aguja de pequeño calibre, que además tiene que ser larga para poder acceder al ovario, no sería lo suficientemente rígida como para atravesar la pared vaginal. Para evitar esto, se pueden emplear sistemas que incluyen una aguja externa de 20 G por cuyo interior se introduce una aguja de menor calibre (25 G) de forma que, al realizar la punción la aguja externa es la que atraviesa la pared de la vagina y el estroma ovárico y la interna es la que accede al folículo (Gastal *et al.* 1995, Doyle *et al.* 2008).

Otro elemento a tener en cuenta para la elección de la técnica es el tamaño del folículo en el que se va a realizar la punción. En el caso de folículos pequeños es conveniente usar el sistema de doble aguja, ya que, al ser un diámetro pequeño es más complicado que la sonda transvaginal contacte directamente con la pared del folículo y, por tanto, el acceso al folículo requiere atravesar el estroma ovárico. Varios estudios han empleado este sistema de doble aguja para folículos  $\geq 18$  mm (Doyle *et al.* 2008) y folículos entre 20 y 23 mm (Gastal *et al.* 1995).

Si el folículo en el que se va a realizar la inyección es un folículo de un tamaño mayor o preovulatorio el acceso a la pared del mismo puede realizarse sin necesidad de atravesar el estroma ovárico mediante la manipulación transrectal del ovario. Por otro lado, la pared de un folículo de mayor tamaño es más gruesa y por tanto una aguja de un diámetro pequeño podría no ser suficiente. Además, estudios en los que se administró indometacina en folículos preovulatorios de 35 mm emplearon agujas de 18 G (Watson & Sertich 1991) de forma satisfactoria, aunque en dicho estudio el acceso al ovario fue a través del flanco como se describió en el apartado anterior.

En base a esto, la aguja que se empleó en los experimentos 2 y 3 de esta tesis doctoral fue una aguja única de 21 G ya que los folículos en los que se realizaron las inyecciones tenían diámetros comprendidos entre 30 y 35 mm. Además el sistema diseñado permitía que la aguja fuera corta (5 cm) ya que se adaptaba a un sistema rígido, que a su vez, iba por dentro de la guía de la sonda transvaginal, aportando mayor seguridad en el momento de introducir la aguja a través de la pared vaginal y del folículo.

## 5. HIPÓTESIS

En la FASE 1 de esta tesis doctoral, se valoró la siguiente hipótesis:

Hipótesis 1: La administración de sulpirida en el periodo periovulatorio en la yegua podría aumentar los niveles plasmáticos de PRL. La hiperprolactinemia inducida podría tener un efecto sobre las concentraciones plasmáticas de LH, como sucede en otras especies, y sobre la ovulación. De esta forma, si se inhibiera la ovulación, se podría determinar si podría deberse al efecto sobre la LH y/o al efecto sobre los mecanismos de ruptura folicular. Para comprobar dicha hipótesis, se realizó el experimento 1.

En la FASE 2 se valoraron las siguientes hipótesis:

Hipótesis 2: La administración intrafolicular de PG exógenas en el periodo periovulatorio en yeguas en las que previamente se ha inhibido la producción de las mismas, mediante la administración de un inhibidor de la COX-2, podría restablecer la ovulación si el tratamiento se administra en el momento en que dichas PG, en condiciones fisiológicas, estarían en el folículo. Se espera que los ovocitos liberados tras la ruptura folicular sean fértiles, puesto que se emplea hCG y, por tanto, los niveles de LH se espera que sean los adecuados para favorecer la maduración de los ovocitos y la expansión del complejo *cumulus-oophorus*. Para comprobar dicha hipótesis se realizó el experimento 2.

Tras obtener los resultados en el experimento 2, se planteó una tercera hipótesis:

Hipótesis 3: La administración intrafolicular de PG exógenas en yeguas al inicio del estro, podría inducir el colapso folicular dentro de las 12 h siguientes al tratamiento, incluso antes de que se produzca la segunda fase de la onda preovulatoria de LH. Aunque la LH inicia la cascada de procesos involucrados en la ruptura folicular, como la síntesis de PG, en este caso al administrarlas directamente en el folículo, no sería necesaria la síntesis endógena. Se desconoce el efecto que podría tener sobre las hormonas esteroideas. Para valorar dicha hipótesis se realizó el experimento 3.



## OBJETIVOS

---

- ▶ **OBJETIVO 1:** Determinar el efecto del tratamiento con sulpirida sobre la concentración de PRL y LH, así como el fallo en la ovulación, durante el periodo periovulatorio.
- ▶ **OBJETIVO 2:** Evaluar el efecto del tratamiento intrafolicular de prostaglandinas exógenas (PGE2 y PGF2 $\alpha$ ) sobre la ruptura folicular y establecimiento de una gestación en yeguas tratadas con flunixin meglumine durante el periodo periovulatorio.
- ▶ **OBJETIVO 3:** Evaluar el efecto del tratamiento intrafolicular de prostaglandinas exógenas (PGE2 y PGF2 $\alpha$ ) sobre la ruptura folicular, concentraciones de LH y hormonas esteroideas en yeguas en estro temprano.



# MATERIAL Y MÉTODOS

---

## 1. ANIMALES

La fase experimental de esta tesis doctoral se ha llevado a cabo en la Granja Docente y de Investigación de la Universidad CEU Cardenal Herrera. Las yeguas son de pura raza española (PRE) y cruzadas de entre 250 y 600 Kg de peso y de edades comprendidas entre los 4 y 20 años. El número de animales fue diferente en función del censo de la Granja Docente en el momento de realización de cada estudio: 10, 5 y 6 yeguas en los experimentos 1, 2 y 3, respectivamente. Todas ellas estuvieron bajo las mismas pautas de alimentación a base de heno de alfalfa, avena y salvado y bajo las mismas condiciones de manejo y cuidados. Estabuladas durante la noche y saliendo a paddock varias horas al día.

Las instalaciones de la Granja Docente cumplen la normativa del RD 53/2013, del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

## 2. EXAMEN ECOGRÁFICO DEL TRACTO GENITAL

El examen ecográfico del tracto genital (útero y ovarios) se llevó a cabo con un ecógrafo portátil (Sonosite NanoMaxx) dotado de una sonda lineal transrectal de 8 MHz. Los diferentes estudios se realizaron en yeguas cíclicas, para ello, se confirmó la presencia de un cuerpo lúteo (CL) mediante ecografía. Una vez detectado el CL, se realizaron ecografías seriadas hasta determinar el momento de la ovulación (Día 0) del siguiente ciclo para comenzar los experimentos.

Los parámetros que se analizaron ecográficamente fueron los siguientes:

➤ **Diámetro folicular:** La medición de los folículos ováricos se llevó a cabo tomando, a partir de una imagen del folículo capturada en su diámetro máximo, dos mediciones perpendiculares entre sí y realizando la media de ambas.

➤ **Ovulación:** La ovulación se confirmó al detectar el colapso del folículo preovulatorio previo junto con la evacuación de más del 90 % del fluido folicular. El momento en el que se detecta la ovulación se consideró como Día 0.

## MATERIAL Y MÉTODOS

➤ **Cuerpo lúteo:** El CL se midió de la misma forma que los folículos, realizando la media de dos mediciones perpendiculares entre sí tomando la imagen con el mayor diámetro. Se pudieron observar dos morfologías de CL:

- CL sólido, cuando la ecogenicidad era homogénea y sin laguna interior.
- Cuerpo hemorrágico (CH), cuando presentaba una laguna en su interior mayor a 5 mm de diámetro con una ecogenicidad variable compatible con un coágulo de sangre.

➤ **Folículos luteinizados anovulatorios:** La formación del HAF/LUF se diagnosticó cuando el folículo se empezó a llenar gradualmente de partículas ecoicas y tanto el diámetro como la ecogenicidad de la pared del folículo, comenzaron a incrementarse. Estas partículas ecoicas, en un primer momento, se movían libremente en el antro folicular después de agitar el ovario varias veces consecutivas para poder observar el movimiento del contenido. Se asumió que la presencia de estas partículas correspondía al comienzo de la hemorragia intrafolicular. Posteriormente, el diagnóstico de un HAF/LUF se confirmó por la ausencia de colapso folicular e incremento en el número de partículas hasta el punto de que era imposible el recuento, pero seguían moviéndose libremente en el antro folicular. Finalmente, el contenido se organizó formando un entramado de bandas de fibrina, que corresponde a la coagulación de éste. El inicio de la formación del HAF/LUF se consideró equivalente al día de la ovulación. El término HAF se empleó para los folículos hemorrágicos que se produjeron espontáneamente, y el término LUF para los folículos hemorrágicos inducidos experimentalmente.

➤ **Edema endometrial:** La valoración del edema endometrial se llevó a cabo mediante ecografía transrectal. Para dicha valoración, se empleó una escala subjetiva con incrementos de un punto entre 0 y 5, siendo 0 la apariencia típica de diestro y 5 el máximo grado de grosor o ingurgitación de los pliegues endometriales.

➤ **Diagnóstico de gestación:** El diagnóstico ecográfico de la gestación se llevó a cabo a los 14 días posteriores a la ovulación. Se realizó una valoración del cuerpo y cuernos uterinos y del cérvix mediante exploración rectal y ecografía transrectal. Las yeguas fueron diagnosticadas como gestantes cuando se evidenció la presencia de la vesícula embrionaria anecoica dentro del útero. Se realizó una medición del tamaño de dicha vesícula y se registraron los datos de la localización y el tamaño.

### 3. TÉCNICA DE INYECCIÓN INTRAFOLICULAR

La inyección intrafolicular se realizó con la yegua mantenida en un potro de contención, en estación. Tras realizar el lavado de toda la zona perineal se administró una sedación con detomidina 0.01 mg/Kg IV (Domosedan, Esteve Veterinaria, Tarragona, España) y butorfanol 0.02 mg/Kg IV (Torbugesic, Fort Dodge Laboratorios, Girona, España).

La inyección folicular transvaginal ecoguiada se realizó con un ecógrafo (Honda Electronics HS-1500 VET) equipado con sonda transvaginal convexa de 9 MHz (HCV 3710MV). La sonda se introdujo en la vagina y se dirigió hacia la derecha o izquierda del cérvix dependiendo del ovario en el que se encontrara el folículo. La sonda transvaginal estaba equipada con un canal de trabajo por el cual se introdujo un tubo de silicona conectado a una aguja de 5 cm de longitud y 21 G, por un extremo, y a una jeringa de 1 mL, conteniendo la solución tratamiento o placebo, por el otro extremo. Dicha solución, se cargó con la aguja conectada al tubo de silicona y la jeringa, directamente desde el vial que la contenía, de forma que todo el sistema tenía la cantidad necesaria para que el volumen total administrado dentro del folículo fuera de 0.5 mL. Para realizar la punción ecoguiada, el ovario se manejó a través del recto aproximándolo a la pared vaginal y una vez visualizado en la pantalla del ecógrafo, se introdujo la aguja en el antro folicular y se administró todo el volumen de la solución. Una vez administrada la solución tratamiento o placebo, la aguja se retiró rápidamente para evitar daño en la pared folicular. Se procuró que el movimiento del animal fuera mínimo durante el procedimiento. Las yeguas se ecografiaron antes de realizar la punción folicular y transcurridos 15 minutos tras ésta, para medir el diámetro folicular y evaluar la posible pérdida de fluido debido al procedimiento.

### 4. TRATAMIENTOS EMPLEADOS

#### 4.1. Gonadotropina coriónica humana

En los experimentos 1 y 2, cuando el folículo preovulatorio alcanzó un diámetro  $\geq 32$  mm y se observó un edema endometrial de 2-3 sobre 5, se administraron 1500 UI de hCG por vía IV (Veterin Corion®, Divasa Farmavic S.A., Tarragona, España) para inducir la ovulación.

### 4.2. Sulpirida

En el experimento 1, las yeguas del grupo tratamiento recibieron 1.5 mg/Kg de sulpirida vía IM (Dogmatil®, 50 mg/mL, Sanofi Aventis S.A., Barcelona, España) cada 12 h desde el momento de administración de la hCG hasta el diagnóstico de ovulación o formación de LUF.

### 4.3. Flunixin meglumine

En el experimento 2, todas las yeguas en sus ciclos control y tratamiento recibieron 1.7 mg/Kg de flunixin meglumine vía IV (Finadyne®, Schering- Plough España, Alcobendas, España) cada 12 h desde el momento de la administración de hCG hasta las 36 h.

### 4.4. Solución de prostaglandinas E2 y F2α

En los experimentos 2 y 3, se administró en los ciclos tratamiento 0.5 mL de una solución de PGE2 y PGF2α localmente en el folículo preovulatorio. La solución se preparó en un vial conteniendo 4.25 mL de agua para inyección, 5 mg de PGE2 (dinoprostona 10 mg/mL, PGE2® Pfizer, Alcobendas, España) y 1.25 mg de PGF2α (dinoprost 5mg/mL, Dinolytic®, Pfizer, Alcobendas, España) siendo el volumen total de 5 mL. La proporción de PGE2/ PGF2α administrada en cada folículo fue de 4:1 (500/125 µg, respectivamente) en un volumen de 0.5 mL.

Por tanto, los tratamientos empleados en cada experimento fueron los siguientes:

- Experimento 1: hCG y sulpirida
- Experimento 2: hCG, flunixin meglumine y la solución de prostaglandinas E2 y F2α
- Experimento 3: solución de prostaglandinas E2 y F2α

## 5. ANÁLISIS LABORATORIAL

### 5.1. Toma de muestras

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular mediante tubos vacutainer ® heparinizados. Inmediatamente se centrifugaron a una velocidad de 2000 g durante 10 minutos. Tras la centrifugación, el plasma fue separado en tubos eppendorf ® y éstos fueron congelados a una temperatura de -20 ° C hasta su posterior determinación hormonal.

En el experimento 1, las muestras se obtuvieron cada 12 h desde el momento de la administración de hCG hasta la ovulación o formación del LUF. En el experimento 3, las

muestras se obtuvieron a las Horas 0, 12, 24, 48 y 72; siendo la Hora 0 el momento de la inyección intrafolicular. Finalmente se obtuvo una muestra el Día 9.

## 5.2. Determinación hormonal mediante ELISA

Se detallan a continuación los kits que se emplearon y los laboratorios en los que se llevaron a cabo los ensayos, en el experimento 3. Se detalla también de cada ensayo los coeficientes de variación (CV) intra-ensayo y la sensibilidad para las diferentes hormonas.

➤ **Hormona luteinizante:** La concentración plasmática de LH se determinó con un kit de ensayo en fase sólida de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA) basado en el principio de unión competitiva (Endocrine Technologies, INC., Newark, California) en los laboratorios de investigación de la Universidad CEU Cardenal Herrera. El coeficiente de variación (CV) intra-ensayo fue del 14.3 % y la sensibilidad del ensayo fue 0.43 ng/mL.

➤ **Progesterona:** La concentración plasmática de progesterona se determinó con un kit de ELISA basado en el principio de unión competitiva (DRG Instruments, GmbH, Marburg, Germany) en los laboratorios de investigación de la Universidad CEU Cardenal Herrera. El coeficiente de variación intra-ensayo fue del 3.9 % y la sensibilidad del ensayo de 0.02 ng/mL.

➤ **Estradiol:** La concentración plasmática de estradiol se determinó con un kit de ELISA basado en el principio de unión competitiva (DRG Instruments, GmbH, Marburg, Germany) en los laboratorios de investigación de la Universidad CEU Cardenal Herrera. El coeficiente de variación intra-ensayo fue del 8.5 % y la sensibilidad del ensayo de 1.4 pg/mL.

## 5.3. Determinación hormonal mediante radioinmunoensayo (RIA).

En el experimento1, las concentraciones plasmáticas de LH y PRL fueron determinadas mediante RIA competitivo de doble anticuerpo homólogo en el Departamento de Reproducción de la Universidad de Agricultura de Cracovia (Polonia). El material necesario fue suministrado por el Dr. Parlow (National Hormone and Peptide Program, Torrance, CA 90502, USA).

➤ **Hormona luteinizante:** Se emplearon hormonas equinas altamente purificadas como estándar (equine LH, AFP-5130A) y un antisuero altamente específico contra el estándar (rabbit

## MATERIAL Y MÉTODOS

anti-eLH, AFP-240580). Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron 11 % y 13.4 %, respectivamente; y la sensibilidad del ensayo fue 0.3 ng/mL.

➤ **Prolactina:** Se emplearon hormonas equinas altamente purificadas como estándar (equine PRL, AFP-8794B) y un antisuero altamente específico contra el estándar (rat anti-ePRL, AFP-261987). Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron 13.6 % y 12.2 %, respectivamente; y la sensibilidad del ensayo fue 0.2 ng/mL.

En el experimento 3, la concentración plasmática de **estrógenos totales** fue determinada en un laboratorio externo Betlabs, Betpharm plc (Lexington, Kentucky) por el Dr. Douglas. El coeficiente de variación intra-ensayo fue 8.2 % y la sensibilidad del ensayo de 20 pg/mL.

## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 6.1. FASE 1

#### ➤ **Experimento 1 (Artículo I)**

Un total de 10 yeguas se estudiaron durante 16 ciclos estrales. Cada ciclo estral fue asignado de forma aleatoria al grupo control o tratamiento en un diseño experimental cruzado. Cuando el folículo alcanzó un tamaño  $\geq 32$  mm y se detectó un edema endometrial de leve a moderado (2-3 sobre 5) todas las yeguas recibieron una dosis de 1500 UI de hCG. El momento en el que se administró la hCG se tomó como Hora 0. Todas las yeguas se ecografiaron, en sus ciclos control (n=8) y tratamiento (n=8), cada 12 h desde la Hora 0 hasta la ovulación o formación de LUF. En los ciclos tratamiento, empezando a la Hora 0, cada yegua recibió 1.5 mg/Kg de sulpirida IM cada 12 h hasta ovulación o formación de LUF. En el caso de que hubiera ovulación múltiple, el intervalo entre la administración de hCG y la ovulación se calculó en base a la ovulación o formación de LUF del primer folículo preovulatorio.

### 6.2. FASE 2

#### ➤ **Experimento 2 (Artículo II)**

Un total de 5 yeguas se estudiaron durante 2 ciclos estrales cada una, con un ciclo de descanso entre ambos. Cada yegua fue asignada de forma aleatoria al grupo control (n=5) o al grupo tratamiento (n=5) en un diseño experimental cruzado. Después del día 15 (Día 0= día de



la ovulación anterior), cuando el folículo alcanzó un tamaño  $\geq 32$  mm y se detectó un edema endometrial de leve a moderado (1.5 sobre 3) todas las yeguas recibieron una dosis de 1500 UI de hCG. El momento en el que se administró la hCG se tomó como Hora 0. En todos los ciclos (control y tratamiento) las yeguas recibieron flunixin meglumine a una dosis de 1.7 mg/Kg IV cada 12 h desde la Hora 0 hasta la Hora 36 o el diagnóstico de ovulación/comienzo de formación del LUF, según lo que sucediera primero. Tres yeguas en sus ciclos tratamiento (n=3) y control (n=3) fueron inseminadas en la Hora 24 con una dosis de semen fresco ( $1 \times 10^9$  espermatozoides con motilidad progresiva) proveniente de un semental de fertilidad probada. En la Hora 32 cada yegua recibió en el folículo preovulatorio una inyección de 0.5 mL conteniendo la solución de PGE2/ PGF2 $\alpha$  en los ciclos tratamiento o la solución placebo en los ciclos control mediante punción transvaginal ecoguiada (protocolo descrito en el apartado 3).

Las yeguas se ecografiaron como mínimo en las Horas 36, 48, 60 y 72. Además, en dos de las yeguas en sus ciclos tratamiento, se realizaron ecografías seriadas cada 2 h desde la Hora 36 hasta la Hora 48 para determinar el momento exacto en el que tuvo lugar la ovulación. Se realizó un último examen ecográfico 9 días después de la ovulación/formación del LUF para evaluar y medir el CL/LUF. El diagnóstico de gestación se realizó a los 14 días de la ovulación/formación del LUF. Las yeguas preñadas recibieron una dosis de 5 mg de dinoprost s.c. para inducir luteolisis y favorecer la reabsorción embrionaria. Además, la vesícula embrionaria fue reducida manualmente.

### ➤ Experimento 3 (Artículo III)

Un total de 6 yeguas se estudiaron durante 2 ciclos estrales cada una, con un ciclo de descanso entre ambos. Cada yegua fue asignada de forma aleatoria al grupo control (n=6) o al grupo tratamiento (n=6) en un diseño experimental cruzado. Cuando el folículo alcanzó un tamaño  $\geq 30$  mm y se detectó un edema endometrial de leve a moderado (2-3 sobre 5) se tomó una muestra de sangre de la vena yugular y se procedió a la inyección del folículo preovulatorio con 0.5 mL de la solución de PGE2/ PGF2 $\alpha$  en los ciclos tratamiento o la solución placebo en los ciclos control mediante punción transvaginal ecoguiada (protocolo descrito en el apartado 3). El momento de la inyección fue tomado como Hora 0. En este experimento no se administró hCG o ningún otro agente inductor de la ovulación.

Las yeguas se ecografiaron a las Horas 0, 12, 24, 48, 72 y diariamente hasta el colapso folicular. El colapso folicular se diagnosticó cuando el folículo preovulatorio previo desapareció y se observó una cantidad de líquido folicular menor al 10 %. Se realizó un último examen ecográfico 9 días después de la ovulación para evaluar y medir el CL.

El término “colapso folicular” se empleó en lugar de ovulación en el grupo que recibió el tratamiento exógeno de prostaglandinas porque se desconoce si la liberación del ovocito tuvo lugar. Para evitar confusión y comparar ambos grupos, en este experimento se empleó el mismo término para hacer referencia a las ovulaciones espontáneas en las yeguas durante sus ciclos control.

La duración del diestro se calculó desde el día del colapso folicular hasta el primer día del ciclo siguiente en el que se detectó edema endometrial. A las yeguas que mostraron diestro prolongado, se les administró una dosis de 2.5 mg de dinoprost IM para inducir la luteolisis.

### **7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos de variable continua se analizaron para comprobar que estaban distribuidos normalmente mediante el test de Anderson-Darling. En los casos en los que los datos no siguieron una distribución normal, éstos fueron transformados usando rangos de valores.

Los datos se analizaron mediante test paramétricos. Todos los datos fueron analizados utilizando el software de análisis estadístico Systat 13 ® (Systat 13, Systat Software Inc., Chicago, IL, USA).

Para valorar si hubo un efecto de grupo, hora o una interacción entre ambos, los datos secuenciales se analizaron mediante un modelo mixto lineal general de varianza con autocorrelación entre mediciones repetidas de un mismo individuo. Cuando se observó un efecto de grupo, hora y/o interacción del grupo con la hora se analizaron los valores mediante el test *t*-Student. Cuando se observó un efecto de grupo dentro de las diferentes horas los datos se analizaron mediante un test no pareado mientras que, en el caso de observar diferencias entre horas dentro de un mismo grupo se analizaron mediante un test pareado.

Un valor de  $P \leq 0.05$  fue considerado como una diferencia estadísticamente significativa mientras que un valor comprendido entre  $P > 0.05$  y  $P \leq 0.1$  fue interpretado como una tendencia significativa. Los datos que hacían referencia a frecuencias (tasas de formación de LUF/ovulación, tasa de preñez) fueron analizados con el test exacto de Fisher.

Todos los datos se expresan en medias  $\pm$  el error estándar de la media (EEM).

# RESULTADOS

## 1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON SULPIRIDA DURANTE EL PERIODO PERIOVULATORIO EN LA YEGUA (I)

### 1.1. Efecto sobre la ovulación

El 90% de los folículos preovulatorios estudiados ovularon y el 10% formaron un LUF a diferentes intervalos desde la administración de hCG, siendo el intervalo medio de ovulación o formación de LUF de  $49.5 \pm 4.2$  h en el grupo control y  $43.5 \pm 2.2$  h en el grupo tratamiento (Tabla 1). Tanto en el grupo control como en el grupo tratamiento, dos yeguas tuvieron ovulaciones dobles. Los LUF fueron detectados en las horas 48 y 72 en los grupos tratamiento y control, respectivamente.

Los CL formados tras las ovulaciones fueron morfológicamente normales en el seguimiento ecográfico.

**Tabla 1.** Efecto del tratamiento con sulpirida sobre la ovulación y formación de folículos luteinizados anovulatorios (LUF)

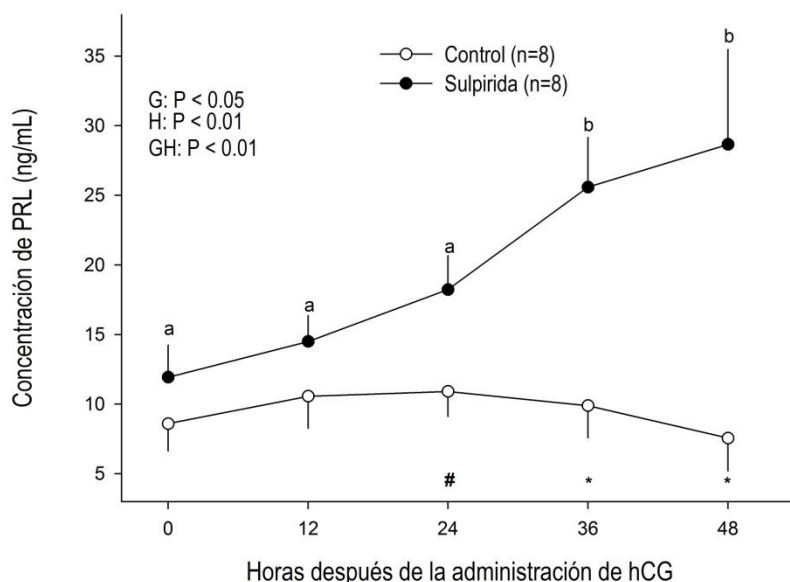
Grupo	n	Diámetro folicular en la Hora 0 (mm $\pm$ EEM)	Intervalo desde la Hora 0 a la Ovulación/LUF				Incidencia LUF (%)
			24-36 h	36-48h	48-72h	Intervalo medio (h)	
Control	8	$36.7 \pm 0.6$	2/8 (25%)	4/8 (50%)	2 <sup>a</sup> /8 (25%)	$49.5 \pm 4.2$	1/10 (10)
Sulpirida	8	$36.1 \pm 1$	3/8 (37%)	5 <sup>a</sup> /8 (63%)	0/8 (0%)	$43.5 \pm 2.2$	1/10 (10)

Cada grupo incluyó 8 yeguas y 10 folículos preovulatorios

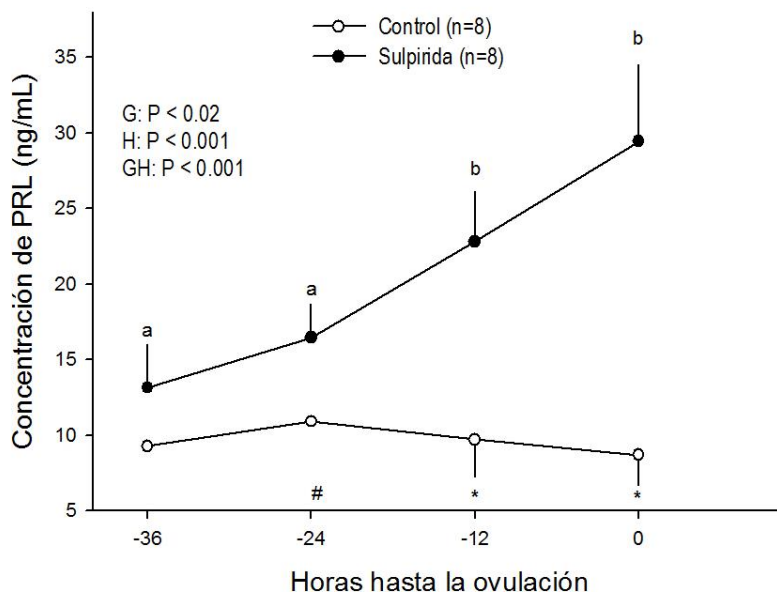
<sup>a</sup> Indica la formación de un LUF en las horas 72 y 48 en los grupos control y tratamiento, respectivamente.

### 1.2. Efecto sobre la concentración de PRL

El tratamiento con sulpirida incrementó las concentraciones plasmáticas de PRL en las yeguas tratadas con respecto a las controles a las 24 h ( $P < 0.1$ ), 36 y 48 h ( $P < 0.05$ ) después del inicio del tratamiento. Además, en el grupo tratamiento hubo un incremento significativo en la concentración de PRL entre las 24 y 36 h ( $P < 0.05$ ) (Figura 1). Puesto que los intervalos entre la administración de hCG y la ovulación fueron diferentes en cada yegua, se normalizaron las concentraciones de PRL al momento de la ovulación (Figura 2). En las yeguas tratadas con sulpirida las concentraciones plasmáticas de PRL fueron más elevadas en las 24 ( $P < 0.1$ ) y 12 h ( $P < 0.05$ ) antes de la ovulación así como en el momento de detección de la ovulación (hora 0,  $P < 0.05$ ).



**Figura 1.** Concentración plasmática de prolactina (PRL)  $\pm$  EEM en las yeguas tratadas con sulpirida y las controles después de la administración de hCG. Se muestran las probabilidades para los efectos del grupo (G) y la hora (H) y la interacción del grupo con la hora (GH). Las diferencias entre grupos a las 24, 36 y 48 h se indican con los símbolos: almohadilla (#,  $P < 0.1$ ) y asterisco (\*,  $P < 0.05$ ). Las concentraciones medias de PRL con diferentes letras en el grupo tratamiento (ab) indica diferencias dentro del mismo grupo ( $P < 0.05$ ). hCG, gonadotropina coriónica humana

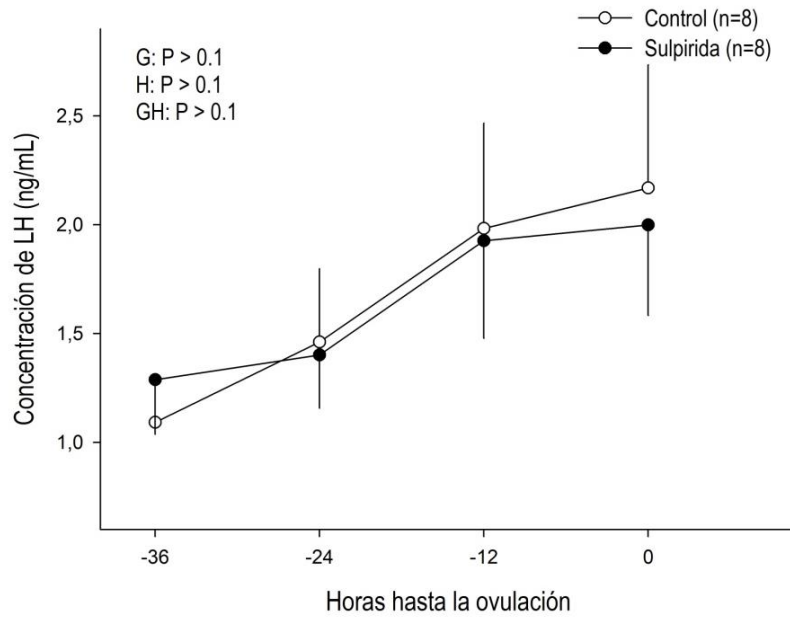


**Figura 2.** Concentración plasmática de prolactina (PRL)  $\pm$  EEM en las yeguas tratadas con sulpirida y las controles normalizada al momento de la ovulación (hora 0). Se muestran las probabilidades para los efectos del grupo (G) y la hora (H) y la interacción del grupo con la hora (GH). Las diferencias entre grupos a las -24, -12 y 0 h se indican con los símbolos: almohadilla (#,  $P < 0.1$ ) y asterisco (\*,  $P < 0.05$ ). Las concentraciones medias de PRL con diferentes letras en el grupo tratamiento (ab) indica diferencias dentro del mismo grupo ( $P < 0.05$ ).

### 1.3. Efecto sobre la concentración de LH

El tratamiento con sulpirida no tuvo ningún efecto sobre la concentración plasmática de LH; no se observaron diferencias significativas entre los grupos control y tratamiento. Las concentraciones plasmáticas de LH siguieron la onda preovulatoria típica inducida tras la administración de hCG en ambos grupos. Las concentraciones se normalizaron al momento de la ovulación para poder comparar las concentraciones medias de LH entre las yeguas que respondieron a la administración de hCG, las que no respondieron y ovularon más tarde y aquellas que ovularon como consecuencia de la onda endógena de LH (antes de las 36 h post hCG) (Figura 3).

## RESULTADOS



**Figura 3.** Concentración plasmática de hormona luteinizante (LH)  $\pm$  EEM en las yeguas tratadas con sulpirida y las controles, normalizada al momento de la ovulación (hora 0). Se muestran las probabilidades para los efectos del grupo (G) y la hora (H) y la interacción del grupo con la hora (GH).

## 2. EFECTO DE LA INYECCIÓN INTRAFOLICULAR DE PROSTAGLANDINAS E2 Y F2 $\alpha$ EN LA YEGUA.

### 2.1. Yeguas tratadas con hCG y flunixin meglumine en el periodo periovulatorio (II)

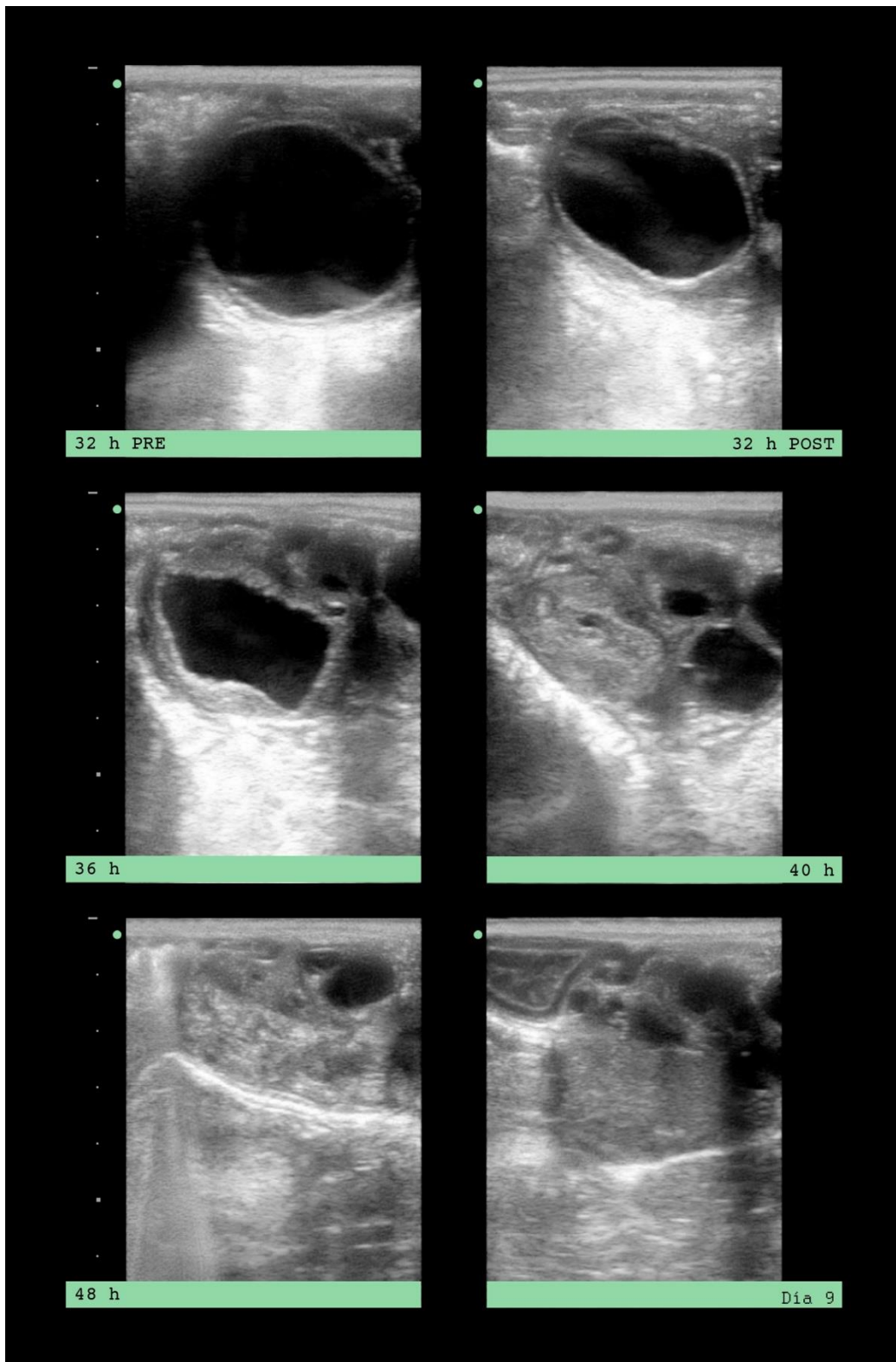
#### 2.1.1. Efecto sobre la ovulación y el diámetro folicular.

Todas las yeguas en sus ciclos tratamiento tuvieron ovulaciones normales, evidenciándose el colapso de la pared del folículo y la evacuación del líquido folicular entre las 36 y 48 h posteriores a la administración de hCG. Por tanto, la tasa de ovulación fue del 100% en las yeguas en las que se administró la solución intrafolicular de prostaglandinas E2 y F2 $\alpha$ , en comparación con las yeguas control que tuvieron una tasa de ovulación del 20% ( $P < 0.05$ ). El momento exacto de la ovulación se pudo determinar en dos yeguas que se monitorizaron a intervalos de 2 horas entre las 36 y 48 h (intervalo estimado de ovulación tras la administración de la hCG) y ovularon a las 8 y 10 h después de la administración del tratamiento intrafolicular, es decir, en la Hora 40 (Figura 4) y 42, respectivamente; siendo la Hora 0 el momento de administración de la hCG.

En 4 de las 5 yeguas control se desarrollaron LUF. El comienzo de la formación del LUF se evidenció en la Hora 48 mediante la presencia de partículas ecogénicas moviéndose libremente en el antro folicular; en las siguientes horas el diámetro de dichos folículos comenzó a aumentar así como el grosor y ecogenicidad de la pared del folículo (signos de luteinización). En la Hora 96 se observó el contenido del folículo formando un entramado de bandas de fibrina compatible con la coagulación del mismo (Figura 5). La única yegua del grupo control que ovuló mostró una disminución del diámetro folicular desde la Hora 32 (34 mm) hasta la Hora 48 (25 mm) y dicho folículo se colapsó completamente en la Hora 60 (Figura 6).

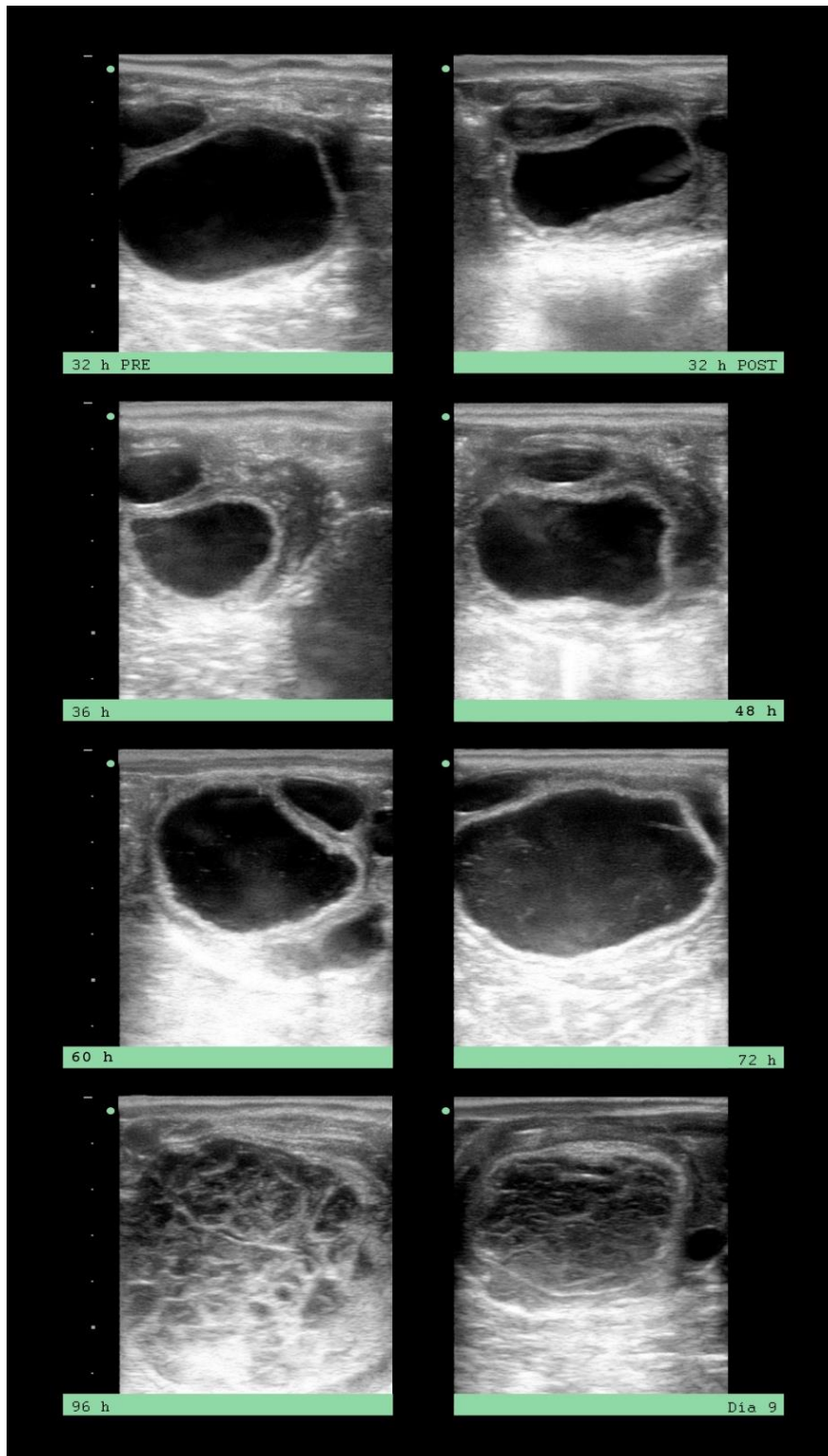
En el grupo tratamiento uno de los folículos mostró signos de hemorragia (partículas ecoicas) en la Hora 32, antes de la punción intrafolicular. Sin embargo, esta yegua ovuló normalmente antes de la Hora 48 (Figura 7).

Se evidenció una reducción del diámetro folicular a los 15 minutos tras la punción ecoguiada del folículo (Hora 32). Esta disminución fue de  $2.1 \pm 1.2$  mm y de  $3.7 \pm 1.7$  mm en los grupos tratamiento y control, respectivamente. Pasadas 4 horas de la punción (Hora 36), la reducción del diámetro del folículo con respecto al folículo inicial antes de la punción fue de  $6.7 \pm 2.4$  mm en el grupo tratamiento y  $4.8 \pm 1.9$  mm en el grupo control. No hubo diferencias entre grupos ( $P > 0.1$ ) en cuanto a la reducción de diámetros tras la punción transcurridos los primeros 15 minutos ni las 4 primeras horas.



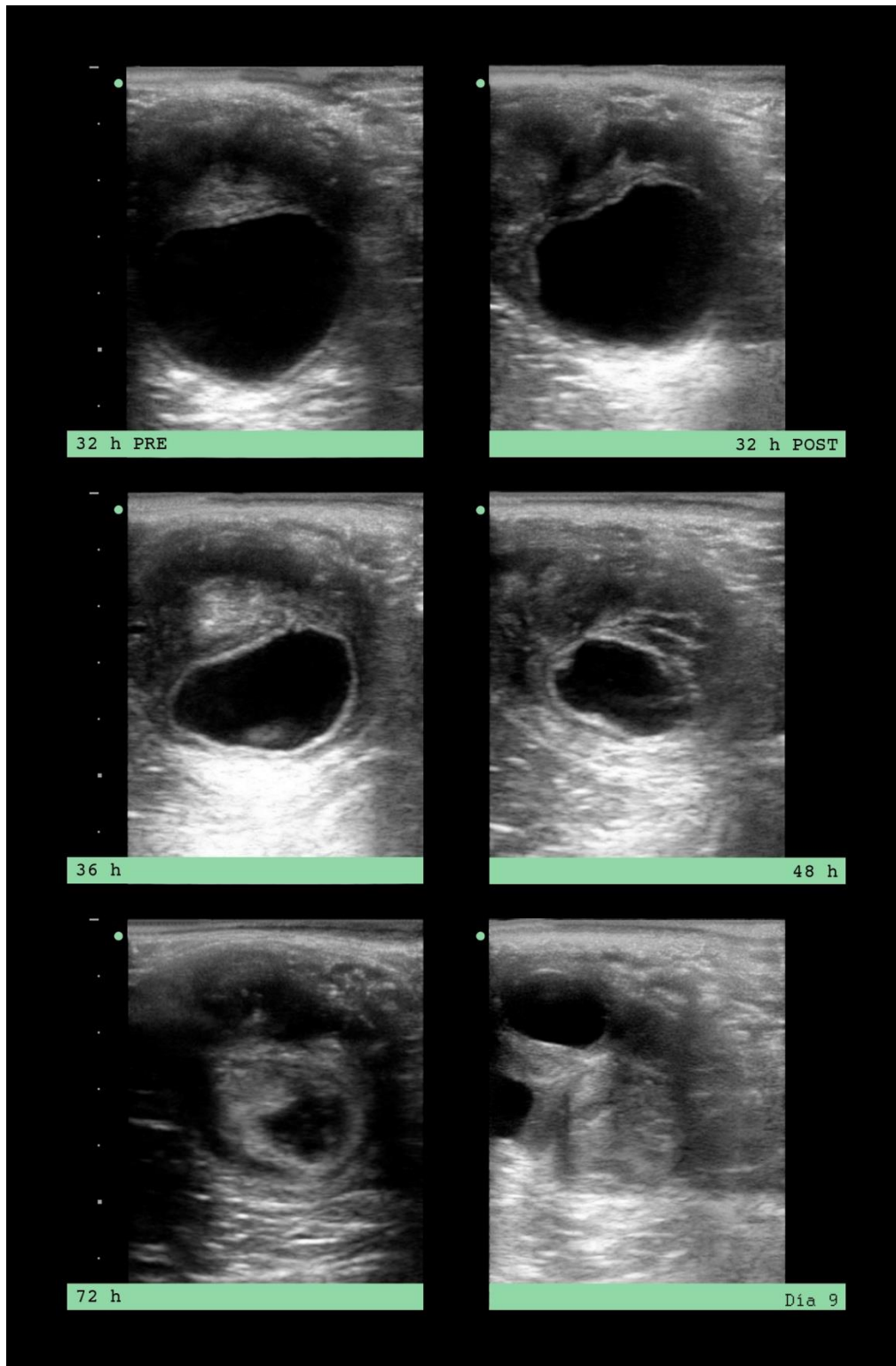
**Figura 4.** Imágenes ecográficas de una de las yeguas en su ciclo tratamiento antes de la punción del folículo preovulatorio (32 h PRE) y 15 min. (32 h POST) después. La ovulación tuvo lugar 40 h después de la administración de la hCG. Nótese el desarrollo del nuevo cuerpo lúteo formado 16 h después de la punción (48 h) y el cuerpo lúteo maduro 9 días después de la ovulación (Día 9). La preñez de esta yegua se confirmó a los 14 días de la ovulación. Hora 0 = momento de administración de la hCG.



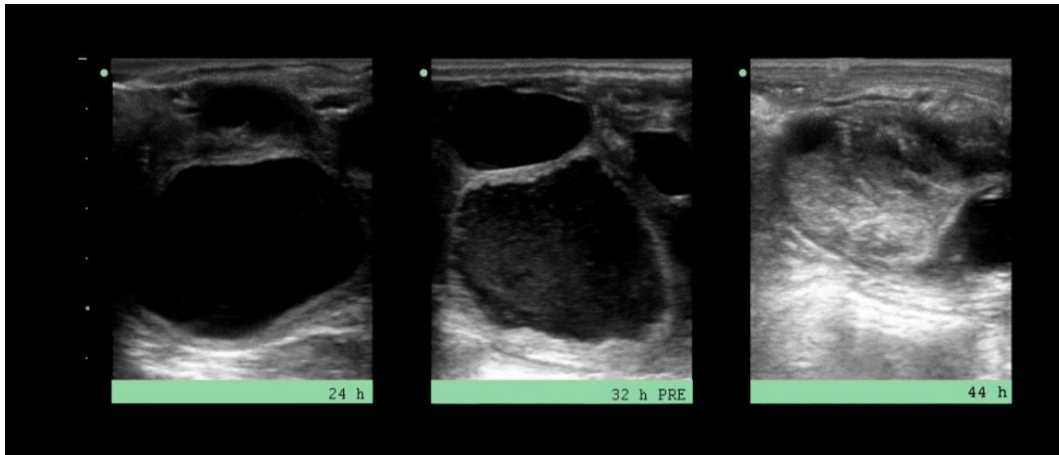


**Figura 5.** Imágenes ecográficas de una yegua en su ciclo control antes de la punción del folículo preovulatorio (32 h PRE) y 15 min (32 h POST) después, y durante la formación del LUF hasta 9 días después del inicio de su formación. Nótese la reducción parcial del diámetro folicular tras la punción (32 h POST y 36 h) probablemente por la pérdida de líquido folicular, y el posterior aumento de diámetro del folículo debido a la entrada de sangre (partículas ecoicas en el antro folicular) durante el desarrollo del LUF (48, 60 y 72 h). El contenido del LUF se organiza formando un entramado de bandas ecoicas a las 96 h de la administración de hCG (96 h). Hora 0 = momento de la administración de hCG.

## RESULTADOS



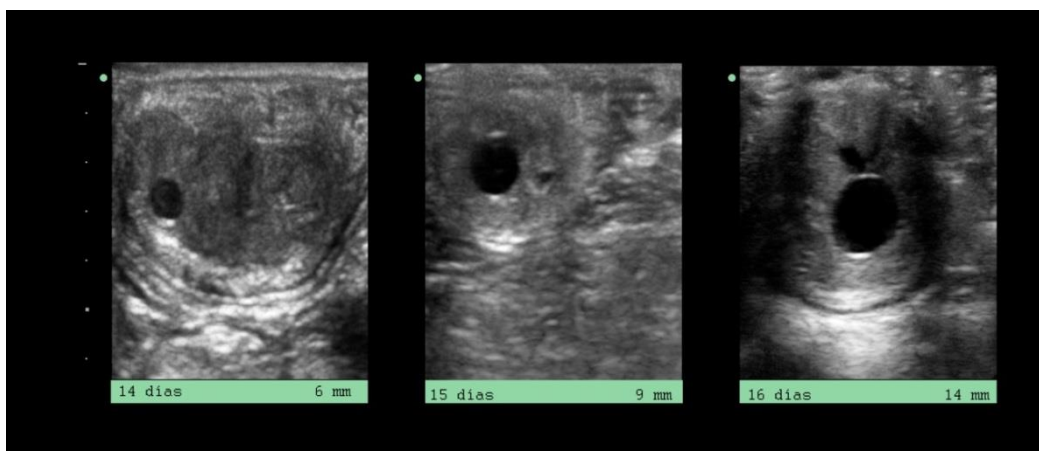
**Figura 6.** Imágenes ecográficas del folículo dominante de la yegua que ovuló en su ciclo control habiendo recibido el tratamiento con flunixin meglumine. Nótese la disminución gradual del diámetro folicular entre la punción (32 h POST) y 48 h después del tratamiento con hCG (48 h). A las 60 h el folículo se había colapsado, aunque se aprecian 2 pequeñas cavidades dentro del área de ovulación (60 h). A los 9 días se observa un cuerpo lúteo sólido. Hora 0 = momento de administración de la hCG.



**Figura 7.** Imágenes ecográficas de una de las yeguas en su ciclo tratamiento a las 24, 32 y 44 h después de la administración de hCG. 24 h: fluido anecoico dentro del antro folicular. 32 h PRE: folículo preovulatorio antes de la punción folicular; nótese la presencia de abundantes partículas ecoicas en el antro, compatibles con hemorragia. 44 h: folículo colapsado; ovulación.

#### 2.1.2. Efecto sobre la fertilidad

Las 3 yeguas que se inseminaron en sus ciclos tratamiento quedaron gestantes, siendo la tasa de preñez de un 100%. Las mismas yeguas se inseminaron en los ciclos control y la tasa de preñez fue del 0%. Las vesículas embrionarias correspondientes fueron identificadas en el día 14 tras la ovulación y midieron 13, 13.5 y 6 mm. La vesícula de menor tamaño fue la que desarrolló la yegua en la que observamos hemorragia folicular antes de la punción en la Hora 32. La medición de esta vesícula embrionaria un día más tarde (15 días tras la ovulación) fue de 9.5 mm (Figura 8), confirmándose así la preñez antes de la reducción manual de la misma.



**Figura 8.** Imágenes ecográficas de la vesícula embrionaria de una de las yeguas en su ciclo tratamiento a los 14, 15 y 16 días post ovulación. Se representan los tamaños de la vesícula embrionaria en milímetros (mm) durante 3 días seguidos.

## 2.2. Yeguas en el inicio del estro (III)

### 2.2.1. Efecto sobre el colapso y diámetro folicular.

El intervalo entre la inyección intrafolicular (Hora 0) y el colapso folicular/ovulación fue más corto ( $P < 0.01$ ) en los ciclos tratamiento ( $20 \pm 5.9$  h) que en los ciclos control ( $72 \pm 10.7$  h) (Tabla 2). En las cuatro yeguas en sus ciclos tratamiento (4/6) se produjo el colapso folicular dentro de las 12 h posteriores al tratamiento intrafolicular de prostaglandinas (Figura 9) y en las 2 yeguas restantes el colapso folicular se produjo en las Horas 24 y 48. En ninguna yegua, en sus ciclos control, se produjo el colapso folicular en las 12 h posteriores a la inyección intrafolicular (0/6); tres yeguas ovularon en la Hora 48 y las tres restantes en la Hora 96. En una yegua del grupo control se observó tras la punción folicular un coágulo de sangre en el interior del antro folicular, el foliculo no mostró ningún signo de luteinización y creció hasta el colapso folicular (Hora 96) (Figura 10).

**Tabla 2.** Características foliculares y diferentes eventos en el grupo control y tratamiento

Grupo	Inyección intrafolicular				Intervalo desde la inyección del foliculo hasta la ovulación (h)	Duración del diestro (días)	Diámetro del CL en el Día 9 (mm)
	Diámetro folicular (mm)			Día del ciclo (días)			
	Pre-iny	Post-iny	Preovulatorio				
Control (n = 6)	33.7 ± 1.2	30.1 ± 1.4	27.9 ± 3.7	18.2 ± 1.3	72 ± 10.7 <sup>b</sup>	15.5 ± 0.9 <sup>a</sup>	24.9 ± 1.3
Tratamiento (n = 6)	33.2 ± 1.0	30.2 ± 2.0	28.6 ± 4.0	18.5 ± 0.6	20 ± 5.9 <sup>a</sup>	18.3 ± 1.2 <sup>b</sup>	24.3 ± 1.5

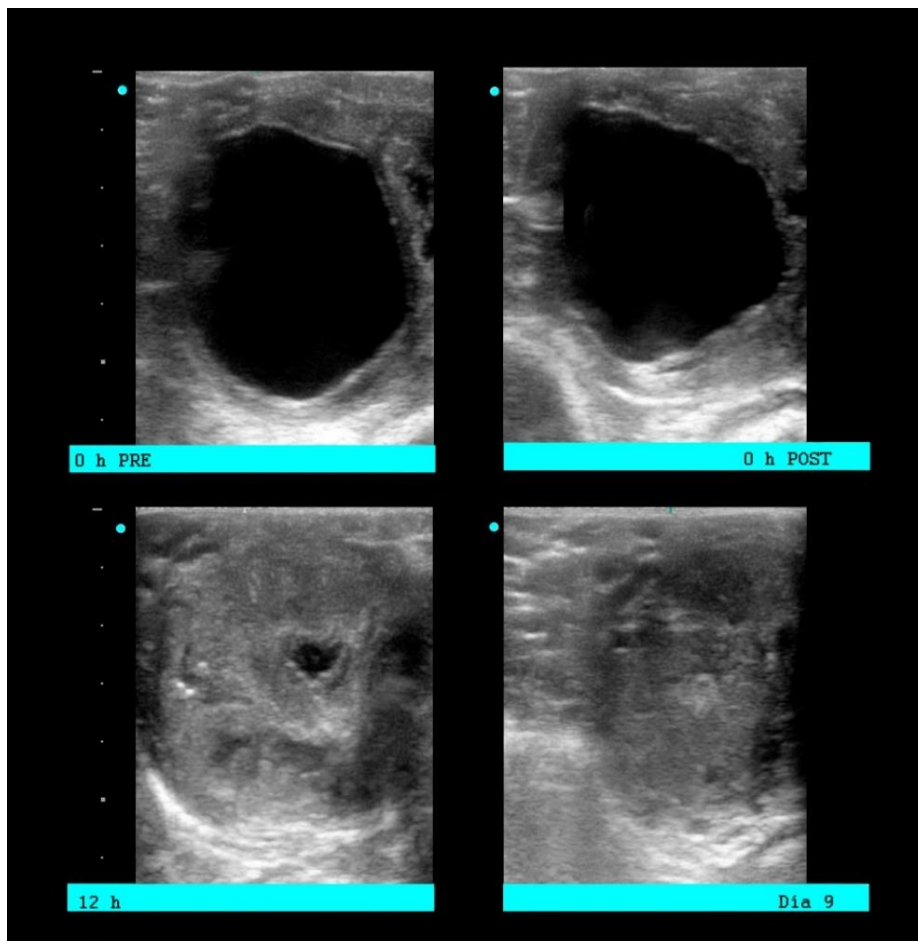
Abreviaturas: h, horas; iny, inyección; mm, milímetros.

En una misma columna, las diferentes letras (a, b) indican una diferencia significativa en el intervalo desde la inyección del foliculo a la ovulación ( $P < 0.05$ ) y la duración del diestro entre grupos ( $P < 0.01$ ).

La punción folicular se realizó cuando el foliculo alcanzó un diámetro  $\geq 30$  mm (entre 30 y 35 mm) y se observó edema endometrial (Hora 0). El día del ciclo en el que se realizó la punción intrafolicular se calculó en base al día de ovulación del ciclo anterior (Día de ovulación = Día 0 del ciclo).

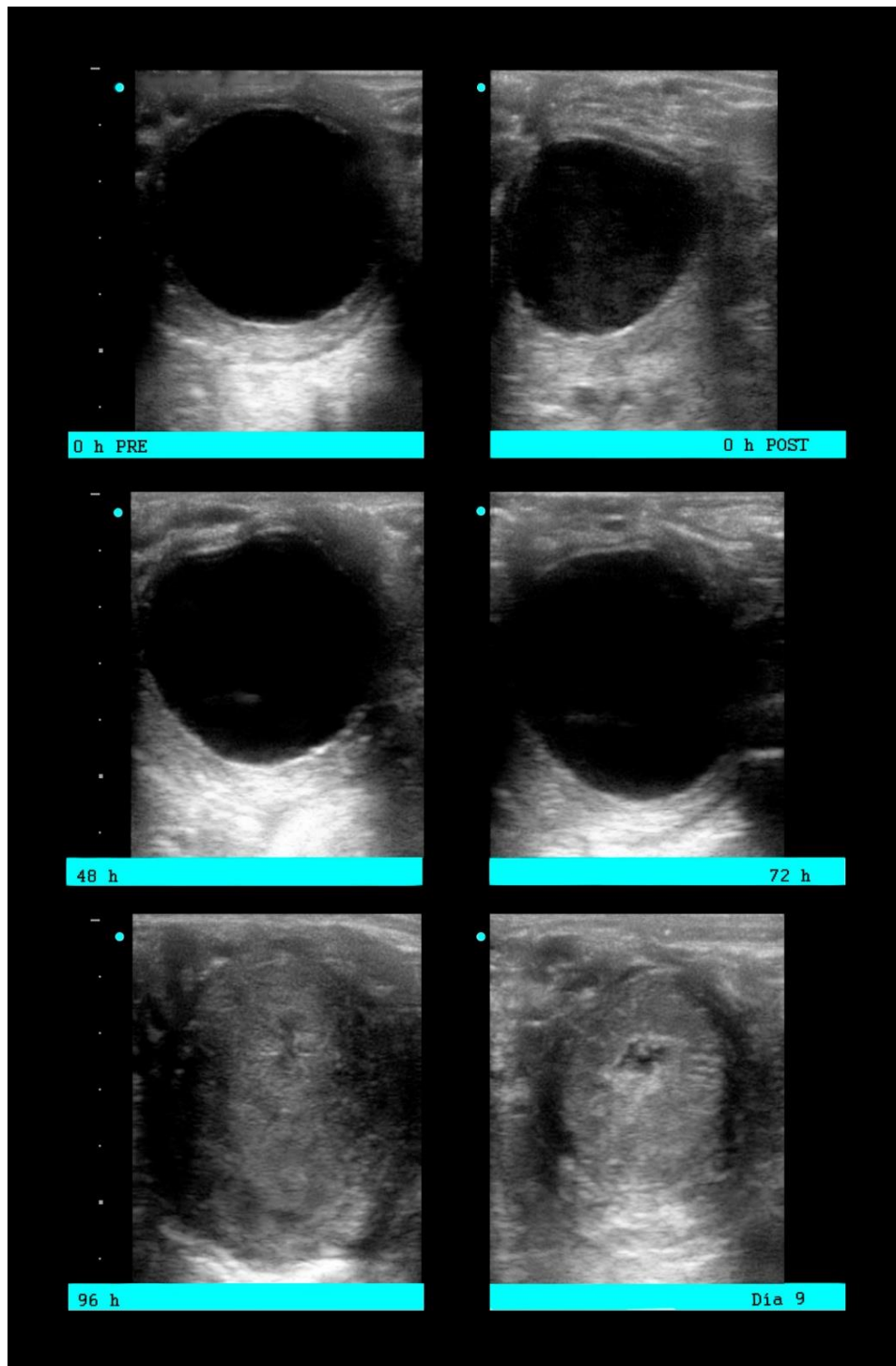
La duración del diestro se calculó desde el día del colapso folicular hasta el primer día del ciclo siguiente en el que se detectó edema endometrial.

La reducción en el diámetro tras los 15 minutos de la inyección intrafolicular fue de  $3 \pm 1.2$  y  $3.6 \pm 2.4$  mm en los ciclos tratamiento y control, respectivamente. El diámetro folicular preovulatorio medio fue de  $27.9 \pm 3.7$  mm y  $28.6 \pm 4$  mm en los grupos tratamiento y control, respectivamente. En los ciclos control, tres yeguas mostraron una reducción del diámetro folicular hasta el momento de la ovulación; el diámetro medio en estas yeguas el día anterior a la ovulación fue de  $21 \pm 4.5$  mm. Las tres yeguas restantes mostraron folículos que crecieron hasta alcanzar un diámetro medio de  $36.2 \pm 1.9$  mm el día antes de la ovulación. Para comprobar si esta diferencia de diámetros pudo influir en los resultados hormonales dentro del grupo control, se compararon las tres yeguas que ovularon con diámetros foliculares reducidos y las tres que ovularon con diámetros foliculares normales, no observándose diferencias.



**Figura 9.** Imágenes ecográficas del folículo preovulatorio de una yegua en su ciclo tratamiento antes (0 h PRE) y 15 minutos después de la punción folicular (0 h POST). El colapso folicular tuvo lugar a las 12 h de la administración de PGE2 y PGF2 $\alpha$ . Nótese el cuerpo lúteo madura 9 días después del colapso folicular (Día 9).

## RESULTADOS

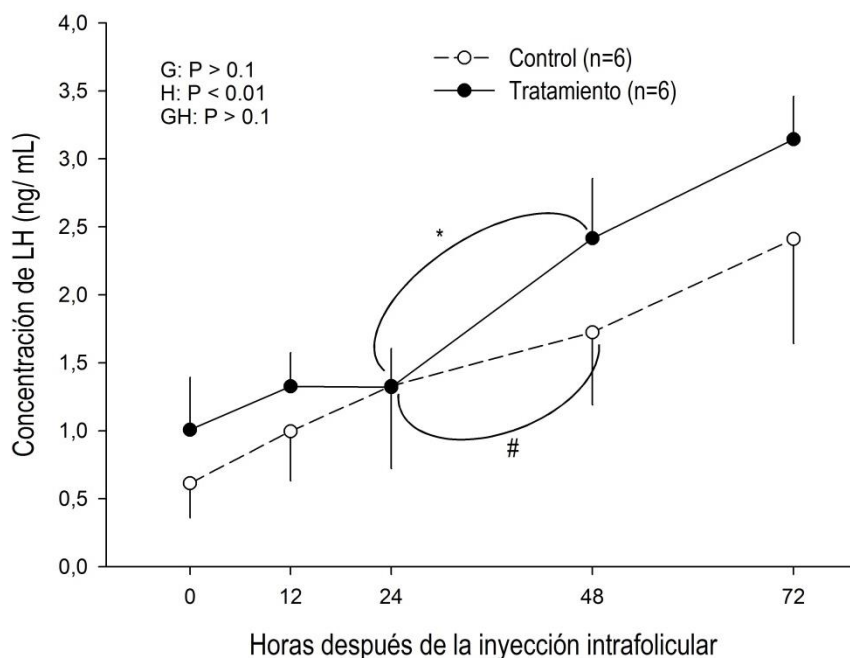


**Figura 10.** Imágenes ecográficas del folículo preovulatorio de una yegua en su ciclo control antes (0 h PRE) y 15 minutos después de la punción folicular (0 h POST). Se observa el folículo a las 48 y 72 h tras la punción. El colapso folicular tuvo lugar entre las 72 y 96 h de la administración de la solución placebo.

### 2.2.2. Efecto sobre las concentraciones de LH, estrógenos y progesterona.

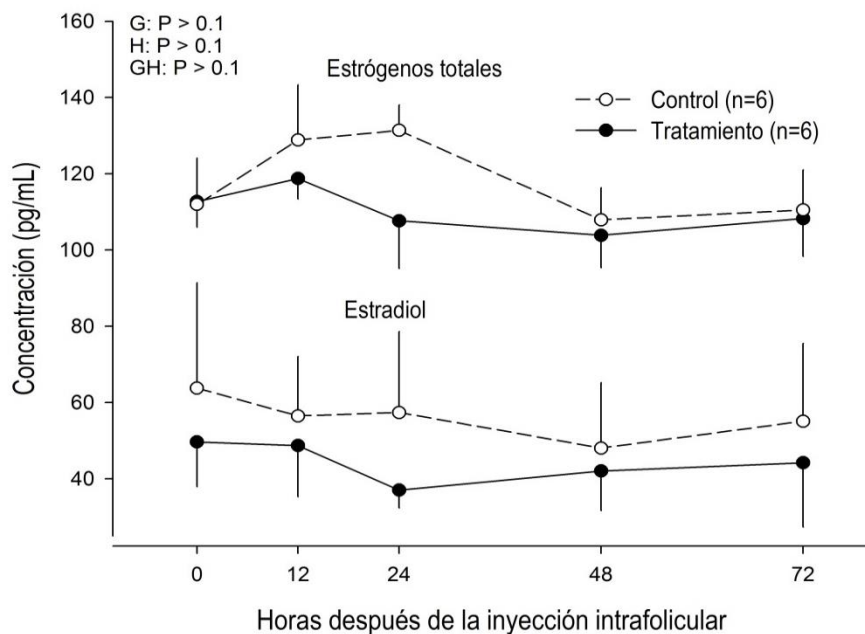
No se observaron diferencias en las concentraciones plasmáticas de LH entre el grupo tratamiento y el control ( $P > 0.1$ ) (Figura 11). Sin embargo, se observó un incremento significativo en la concentración de LH entre la Hora 24 y 48 en el grupo tratamiento ( $P = 0.03$ ) y una tendencia en el grupo control ( $P = 0.08$ ). Tampoco se observaron diferencias en los niveles plasmáticos de estrógenos totales ni de estradiol entre ambos grupos ( $P > 0.1$ ) (Figura 12).

Los niveles plasmáticos de progesterona no fueron diferentes entre grupos ( $P > 0.1$ ) (Figura 13). Sin embargo, se observó una tendencia significativa en el efecto de la hora ( $P = 0.06$ ) y en la interacción entre la hora y el grupo ( $P = 0.08$ ). Este efecto en la hora vino reflejado por un aumento en la concentración de progesterona entre las Horas 48 y 72 en el grupo tratamiento ( $P < 0.05$ ); mientras que en el grupo control no se observaron diferencias. En las 4 yeguas que respondieron a la administración de prostaglandinas dentro de las 12 h, las concentraciones de progesterona permanecieron bajas durante las 60 h siguientes al colapso folicular. La concentración de progesterona en el Día 9 no fue diferente entre ambos grupos y la morfología de los CL fue ecográficamente normal.

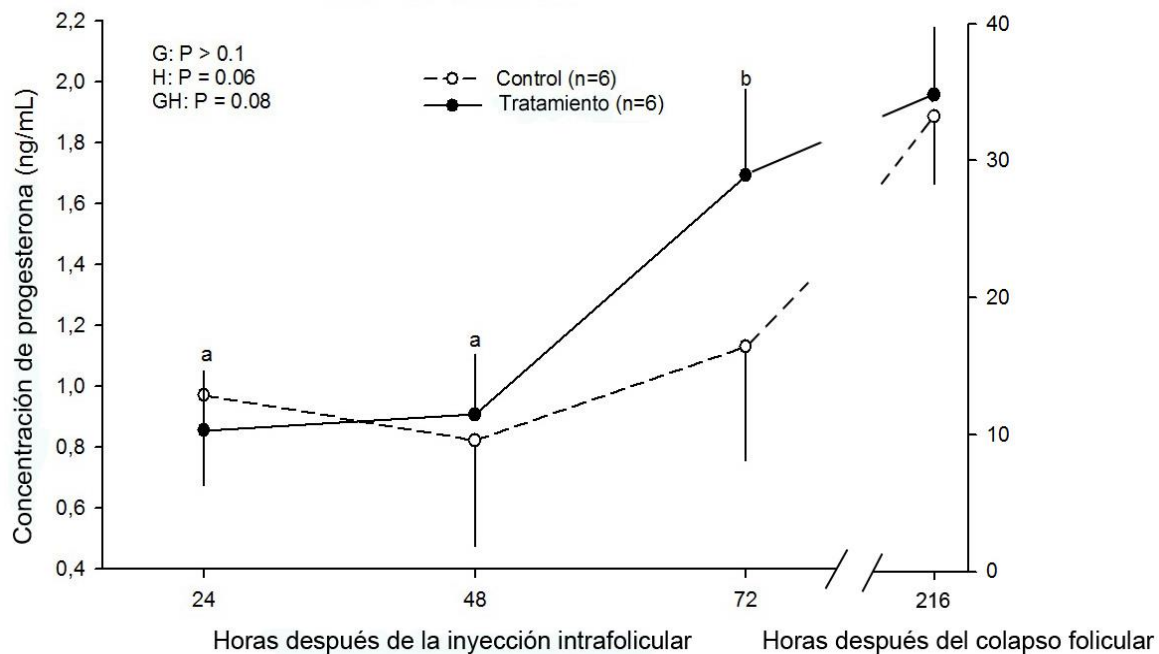


**Figura 11.** Concentración plasmática de hormona luteinizante (LH)  $\pm$  EEM en las yeguas tratadas y las controles desde el momento de la inyección intrafolicular (Hora 0). Se muestran las probabilidades para los efectos del grupo (G) y la hora (H) y la interacción del grupo con la hora (GH). Entre las 24 y 48 h se observa una diferencia significativa (\*,  $P = 0.03$ ) y una tendencia (#,  $P = 0.08$ ) en los grupos tratamiento y control, respectivamente.

## RESULTADOS



**Figura 12.** Concentración plasmática de estrógenos totales y estradiol  $\pm$  EEM en las yeguas tratadas y las controles desde el momento de la inyección intrafolicular (Hora 0). Se muestran las probabilidades para los efectos del grupo (G) y la hora (H) y la interacción del grupo con la hora (GH).



**Figura 13.** Concentración plasmática de progesterona  $\pm$  EEM en las yeguas tratadas y las controles después de la inyección intrafolicular (Hora 0) y a las 216 h (Día 9) del colapso folicular. Se muestran las probabilidades para los efectos del grupo (G) y la hora (H) y la interacción del grupo con la hora (GH). Las concentraciones medias de progesterona con diferentes letras en el grupo tratamiento (ab) indica diferencias dentro del mismo grupo ( $P < 0.05$ ) entre las 48 y 72 h.



### 2.2.3. Efecto sobre la duración del diestro.

Dos yeguas, en sus ciclos tratamiento, mostraron diestro prolongado (ausencia de edema endometrial y CL visible a los 18 días tras la ovulación) y se les administró una dosis de 2.5 mg de dinoprost IM para inducir la luteolisis. La duración del diestro ( $18.3 \pm 1.2$  días) fue más larga ( $P < 0.05$ ) en los ciclos tratamiento, en los cuales se indujo el colapso folicular con el tratamiento de prostaglandinas, que en los ciclos control en los que las ovulaciones fueron espontáneas ( $15.5 \pm 0.9$  días).



# DISCUSIÓN

---

## 1. EFECTO DE LA HIPERPROLACTINEMIA SOBRE LA OVULACIÓN Y FORMACIÓN DE FOLÍCULOS HEMORRÁGICOS ANOVULATORIOS EN LA YEGUA (I).

### 1.1. Efecto sobre la ovulación

En la primera fase de esta tesis doctoral se confirma que el tratamiento con sulpirida, bajo el protocolo empleado en el Experimento 1 en yeguas cíclicas durante el periodo periovulatorio (después de la administración de hCG), incrementa la concentración de PRL a las 24 horas del inicio del tratamiento. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores en yeguas cíclicas (Guillaume *et al.* 2003, Johnson & Becker 1987, Pinaffi *et al.* 2012) y también en conejos (Lin *et al.* 1988). Sin embargo, la hiperprolactinemia inducida por la sulpirida no tuvo ningún efecto negativo sobre la ruptura folicular. Contrariamente, la hiperprolactinemia inducida por la sulpirida sí que redujo la tasa de ovulación en conejos, de forma que, tras la administración de hCG, ovularon un 84.1% en el grupo control y un 61.5 % en el grupo tratado con sulpirida (Lin *et al.* 1988). Otros estudios, también realizados en conejos, sugirieron que la inhibición de la ovulación se debía, en parte, a la reducción en la generación de plasmina por el ovario (Yoshimura *et al.* 1992, Yoshimura *et al.* 1994). Las concentraciones de PRL alcanzadas en el estudio mencionado anteriormente en conejos fueron muy diferentes entre los grupos control y tratamiento (11 veces más elevadas que los controles) si los comparamos con las obtenidas en este estudio (2.5 veces mayores). Este hecho, podría explicar la falta de inhibición sobre la ovulación de las yeguas tratadas con sulpirida, en las que la hiperprolactinemia no fue suficiente para inhibir la ovulación.

En los estudios mencionados anteriormente llevados a cabo en conejos no hubo evidencia de luteinización de los folículos ni tampoco se evidenció un aumento en la concentración de progesterona como sucede cuando se inhiben las prostaglandinas mediante el uso de indometacina en el periodo periovulatorio. Sin embargo, en un estudio reciente llevado a cabo en yeguas postparto un 56 % de las yeguas formaron LUF tras el tratamiento diario de 750 mg de sulpirida (Zagrajczuk & Okolski 2010). En este estudio, las concentraciones de PRL y LH fueron 2.5 veces mayores en las yeguas tratamiento en el momento de la ovulación o formación de LUF. No se pudo determinar si la formación de LUF en dicho estudio fue debida al aumento en la concentración de PRL o al de LH, teniendo en cuenta que en estudios previos realizados en yeguas se ha relacionado concentraciones elevadas de LH con la formación de LUF (Ginther *et*

## DISCUSIÓN

*al.* 2008c). En nuestro estudio, las concentraciones de LH no fueron diferentes entre ambos grupos. Por otro lado, otro estudio clínico no encontró diferencias en las concentraciones de PRL entre yeguas que ovularon normalmente y yeguas que formaron HAF (Metcalf & Roser 2010). En nuestro estudio, sólo dos yeguas desarrollaron LUF. La yegua control que desarrolló el LUF tuvo concentraciones plasmáticas de PRL similares a las yeguas controles (< 10 ng/mL), mientras que la yegua del grupo tratamiento que desarrolló el LUF tuvo concentraciones de PRL (30.9 ng/mL) también similares a las que ovularon del grupo tratamiento (29.1 ng/mL). En nuestro estudio, la LH no fue mayor en el grupo tratamiento y la PRL, pese a ser mayor en el grupo tratamiento, no fue un factor crítico para el desarrollo de LUF en las dos yeguas.

Una posible explicación a este hecho, es que sólo ciertos niveles de hiperprolactinemia sean capaces de alterar el proceso de ruptura folicular alterando/inhibiendo alguna de las partes del proceso de degradación de la pared folicular. Como queda demostrado en el estudio de Metcalf (Metcalf & Roser 2010) y también en éste, yeguas con niveles bajos de PRL también pueden desarrollar HAF, no constituyendo, aparentemente un factor crítico para su formación.

En este estudio, no se ha analizado si el tratamiento empleado tuvo algún efecto sobre los receptores de LH o FSH, como se ha visto en otros estudios (Klemcke *et al.* 1984). Por tanto, no podemos analizar esta vía de actuación.

### **1.2. Dosis de sulpirida y pauta de administración**

El hecho de que la hiperprolactinemia no fuera suficiente, puede deberse a la dosis y pauta empleada en el estudio. Sin embargo, la dosis fue escogida en base a otros estudios realizados en yeguas en los que se consigue un incremento en la concentración de PRL entre 3 y 6 veces superior al de las yeguas control (Besognet *et al.* 1997, Mari *et al.* 2009). En cualquier caso, la dosis de 1.5 mg/Kg administrada cada 12 h y/o la duración del tratamiento en este estudio no pareció ser suficiente para alterar la ovulación. En cuanto a la duración del tratamiento, otros estudios en conejos, en los que se administró hCG para inducir la ovulación, consiguieron bloquear la ovulación con la perfusión ovárica de dosis elevadas de PRL (10000 ng/mL) durante 12 h. Sin embargo, las otras dos dosis que se emplearon en dicho estudio, 100 y 10 ng/mL no consiguieron bloquear la ovulación (Yoshimura *et al.* 1992). En nuestro estudio, la máxima concentración de PRL que se alcanzó fue de 45 ng/mL en una de las yeguas tratamiento.

## 2. EFECTO DEL TRATAMIENTO INTRAFOLICULAR DE PROSTAGLANDINAS E2 Y F2 $\alpha$ SOBRE LA OVULACIÓN Y LA FERTILIDAD EN YEGUAS (II Y III)

### 2.1. Efecto sobre la ovulación

La administración intrafolicular de la solución combinada de PGE2 y PGF2 $\alpha$  es un potente inductor de la ovulación, incluso en el estro temprano cuando todavía no se ha producido el incremento repentino en la concentración de LH en la parte final de su onda preovulatoria. En la mayoría de yeguas se produjo el colapso folicular dentro de las 12 h siguientes al tratamiento. Fisiológicamente, la segunda fase de la onda preovulatoria de LH es la que inicia la cascada de eventos que van a desencadenar la expresión de la enzima COX-2 en las células de la granulosa (Sirois & Dore 1997). La secuencia exacta de procesos desde el aumento de LH hasta la ovulación se desconoce a día de hoy. Estudios realizados en ratones en los que se anula la expresión de ciertos genes demostraron que dichos ratones presentaban deficiencias en la ovulación. Ratones en los que se inhibió la COX-2 o el receptor de progesterona, no ovulaban quedando los ovocitos atrapados dentro del CL (Robker *et al.* 2000a). La LH induce la expresión de la COX-2 en las células de la granulosa y sus productos, las prostaglandinas, activan las metaloproteinasas (MMP) y la plasmina que son las que van a digerir la pared folicular en el ápex (Sirois & Dore 1997, Li *et al.* 2006). Otros estudios realizados en primates en los que se evaluaba el efecto de LH, PGE2 y PGF2 $\alpha$  y la combinación entre ellas, sobre la expresión de ciertas MMP en las células de la granulosa también sugirieron la acción directa de la LH sobre la expresión de ciertas MMP en las células de la granulosa por una vía independiente de las prostaglandinas (Duffy & Stouffer 2003). La administración directa de los productos de la COX-2 dentro del folículo preovulatorio, es decir la solución de PGE2 y PGF2 $\alpha$  empleada en la segunda fase de esta tesis doctoral, podría haber activado las MMP y el resto de enzimas encargadas de la digestión de la pared del folículo antes de que la LH induzca la expresión endógena de la COX-2.

Con este estudio no se puede determinar si las dos prostaglandinas (PGE2 y PGF2 $\alpha$ ) son necesarias para inducir la ovulación satisfactoriamente y cuál es la dosis mínima efectiva. En esta línea, un estudio previo comparó el efecto de PGE1, PGE2 y PGF2 $\alpha$  sobre la tasa de ovulación en ratas tratadas con indometacina (Gaytan *et al.* 2002). Las prostaglandinas de la serie E fueron superiores a la PGF2 $\alpha$  a la hora de inducir la ruptura folicular. Aunque la PGF2 $\alpha$  fue solo parcialmente efectiva en la inducción de la ovulación, fue superior que en las ratas del grupo control que se trataron sólo con indometacina. Sin embargo, en estudios realizados en

## DISCUSIÓN

primates tratados con indometacina y hCG, la administración sistémica de PGF<sub>2</sub>α consiguió inducir la ovulación (Wallach *et al.* 1975). En yeguas, la administración IV de cloprostenol (análogo sintético de la PGF<sub>2</sub>α) no consiguió revertir el efecto del flunixin meglumine (Cuervo-Arango 2012). En el mencionado estudio, no se pudo determinar si la pauta o la dosis fueron insuficientes, o si la PGF<sub>2</sub>, por sí sola, no fue efectiva para producir el colapso folicular.

El efecto sobre la ovulación se puede atribuir a las prostaglandinas y no a la punción de la pared folicular ya que las yeguas control también recibieron un tratamiento placebo con la misma técnica y solo el 20 % de estas yeguas ovularon, como se esperaba. Dicho porcentaje, está en concordancia con otros estudios realizados en yeguas con el mismo protocolo de flunixin meglumine y se observó que un 27 % (Cuervo-Arango *et al.* 2011) y 17 % (Cuervo-Arango & Domingo-Ortiz 2011) de las yeguas ovuló pese a recibir el tratamiento.

### **2.2. Efecto sobre la fertilidad**

Según los resultados obtenidos en el experimento 2, el protocolo intrafolicular de prostaglandinas empleado, además de producir la ruptura de la pared folicular y la ovulación, también permite la liberación normal del ovocito dentro del oviducto puesto que las 3 yeguas inseminadas en sus ciclos tratamiento quedaron gestantes. En concordancia con otros estudios realizados sobre tasas de preñez en yeguas con HAF espontáneos (McCue & Squires 2002), en nuestro estudio, las yeguas inseminadas en sus ciclos control y que desarrollaron LUF, tampoco quedaron gestantes. Estudios histológicos realizados en conejos demostraron como el ovocito permaneció atrapado en el entramado de contenido coagulado en el interior del LUF no siendo posible la liberación de éste al oviducto ni, por tanto, la fertilización (Salhab *et al.* 2003). En nuestro estudio, una de las yeguas en su ciclo tratamiento mostró signos de desarrollo de LUF (presencia de numerosas partículas ecóicas en el antro folicular) antes de la administración del tratamiento en la Hora 32; esto indica que la yegua había iniciado su onda preovulatoria de LH antes del tratamiento con hCG ya que dichos signos de desarrollo de LUF ocurren entre las 40 y 44 h después de la hCG (Cuervo-Arango *et al.* 2011). Incluso con el indicio de hemorragia dentro del folículo, la yegua ovuló tras el tratamiento intrafolicular y el ovocito liberado fue fértil ya que la yegua quedó gestante. La vesícula embrionaria diagnosticada en esta yegua en el Día 14 presentó un tamaño más pequeño de lo normal, condición conocida con el término de “small for age” (en inglés). Aunque este tipo de vesículas embrionarias están asociadas a pérdidas embrionarias tempranas (Bergfelt *et al.* 1992), en este estudio no se valoró la viabilidad de las

gestaciones, ya que se indujo la luteolisis mediante la administración de 5 mg de dinoprost s.c. en todas las yeguas diagnosticadas como gestantes.

### **2.3. Dosis de prostaglandinas E2 y F2 $\alpha$ y momento de administración del tratamiento intrafolicular**

La elección de la dosis y proporción de las prostaglandinas E2 y F2 $\alpha$  empleada en el estudio se hizo en base a los estudios realizados por Sirois y Doré en 1997. En dichos estudios, las concentraciones de prostaglandinas E2 y F2 $\alpha$  aumentaban en el líquido folicular entre las 33 y 36 h tras la administración de la hCG siendo de 40 ng /mL y 10 ng/mL las concentraciones de PGE2 y PGF2 $\alpha$ , respectivamente. Por tanto, en ese rango de horas, la proporción de ambas prostaglandinas es de 4:1. La concentración total empleada (500/125  $\mu$ g) es mucho más elevada que las concentraciones fisiológicas mencionadas anteriormente teniendo en cuenta que, un folículo preovulatorio de 35 mm contiene un volumen de líquido folicular de 20-30 mL. Sin embargo, se eligió una cantidad mayor por las posibles pérdidas que pudiera haber durante la punción folicular a través del orificio de la aguja.

En cuanto a la hora de administración del tratamiento, en el experimento 2, se realizó a las 32 h de la hCG puesto ya que es a partir de esta hora cuando de forma fisiológica comienza a haber PGE2 y PGF2 $\alpha$  en el líquido folicular (Sirois & Dore 1997). Por otro lado, la manipulación del folículo preovulatorio más cerca del momento de la ovulación podría implicar la ruptura accidental del folículo, debido a la menor consistencia de éste. En el experimento 3, la administración del tratamiento se realizó en el momento en el que se detectó un folículo  $\geq$  30 mm y se detectó un grado de edema endometrial de 2-3 sobre 5, implicando estos dos hechos que la yegua estaba en los primeros días del estro. El tratamiento se administró, de media, en el Día 18 del ciclo.

### **2.4. Efecto sobre las concentraciones de LH, estrógenos y progesterona**

El hecho de que, tras el colapso folicular, la LH continuara incrementándose gradualmente tanto en el grupo control como en el tratamiento, indica que el colapso folicular inducido por la administración de prostaglandinas no bloquea la liberación de LH. Aunque en el momento del tratamiento sí que había LH, esto no implica que, esos niveles de concentración fueran críticos para inducir el colapso folicular siendo, por tanto, las prostaglandinas las desencadenantes de dicho colapso. En esta línea, un estudio realizado en ratas tratadas con Nembutal para bloquear

## DISCUSIÓN

la onda de LH mostraron un 81 % de ovulación en los animales tratados con 1.5 mg de PGE2 de forma sistémica (Tsafiri *et al.* 1972).

La inyección intrafolicular de prostaglandinas no afectó a las concentraciones de estrógenos totales y estradiol, y los niveles plasmáticos observados son similares a estudios previos llevados a cabo durante el estro en yeguas (Palmer & Terqui 1977, Meinecke *et al.* 1987).

La principal hormona que estimula la producción de progesterona por el CL es la LH (Niswender *et al.* 2000). El inicio en el incremento de la producción de progesterona se define como el primer día en el que la concentración de progesterona está por encima de 1 ng/mL, 24 h después de la ovulación (Hinrichs *et al.* 1991). En el experimento 3, la concentración de progesterona en 4 de las yeguas que respondieron al tratamiento con prostaglandinas permanece por debajo de 1 y 2 ng/mL dentro de las 36 y 60 h del colapso folicular, respectivamente. El hecho de que en estas yeguas se produjera el colapso folicular antes de la parte final de la onda preovulatoria de LH podría explicar el lento incremento en la secreción de progesterona por el nuevo CL en comparación con datos obtenidos en estudios previos (Townson *et al.* 1989). Este lento incremento de la secreción de progesterona los primeros días del desarrollo del CL podría explicar la mayor duración del diestro en el grupo tratamiento. Sin embargo, el CL maduro de las yeguas tratamiento pareció recobrar la capacidad total de producción de progesterona, ya que las concentraciones a los 9 días después del colapso folicular fueron similares en ambos grupos. Estos resultados no están en concordancia con estudios realizados en vacas en las que se comparó el efecto de la aspiración del folículo dominante antes y después de la onda preovulatoria de LH, y tras los cuales demostraron la necesidad de la onda de LH para la formación y desarrollo del CL (Hayashi *et al.* 2006). En el citado estudio se diseñaron 3 grupos en los que se realizaron las aspiraciones foliculares en diferentes momentos del ciclo: en la fase luteal, antes (Pre-LH) y después de la onda de LH (Post-LH), y se añadió, además, un grupo control. Todos los grupos recibieron una dosis de PGF2 $\alpha$ . En el grupo Pre-LH se realizó la aspiración del folículo a las 42 h; en dicho grupo no se observó la formación de CL y las concentraciones plasmáticas de progesterona permanecieron por debajo de 1 ng/ mL en las sucesivas mediciones (hasta los 9 días), además la concentración intrafolicular de PGE2 fue significativamente más baja que en el grupo Post-LH. El hecho de que en nuestro estudio se formaran CL tras el colapso folicular antes de la onda de LH puede ser debido a la administración de las prostaglandinas, además tras el colapso folicular los niveles de LH continuaron incrementándose y puede que actuaran sobre las células de la granulosa. En el estudio realizado en vacas no midieron las concentraciones plasmáticas de LH.



### **3. POSIBLES APLICACIONES DEL TRATAMIENTO INTRAFOLICULAR DE PROSTAGLANDINAS E2 Y F2 $\alpha$**

Aunque el protocolo empleado en la segunda fase de esta tesis doctoral está en una fase experimental y se ha basado en pocas yeguas, los resultados obtenidos han sido alentadores.

El tratamiento intrafolicular de PGE2 y PGF2 $\alpha$  podría ser una buena alternativa terapéutica para las yeguas con tendencia a formar HAF (yeguas “repetidoras”). Aunque el tratamiento no se ha probado en yeguas con historia de una incidencia alta de HAF espontáneos en los experimentos realizados, la similitud que presentan los LUF inducidos experimentalmente mediante el uso de flunixin meglumine y los HAF que se producen espontáneamente (Cuervo-Arango & Newcombe 2012) hacen que este protocolo terapéutico experimental sea esperanzador. Por otro lado, es complicado diseñar un experimento clínico en estas yeguas debido a la dificultad de predecir si la yegua desarrollará un HAF en un ciclo concreto, por lo que resultaría complicado confirmar la efectividad del tratamiento.

En cualquier caso, según los resultados obtenidos en el experimento 2, se podría aplicar el tratamiento intrafolicular entre las 30 y 36 h tras la administración de hCG o de otros fármacos inductores de la ovulación como la deslorelina o histerelina en dichas yeguas repetidoras.

### **4. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN**

Las futuras líneas de investigación, en las que ya se está trabajando, se centran en la segunda fase de esta tesis doctoral: el tratamiento intrafolicular de PGE2 y PGF2 $\alpha$ .

Una de las líneas iría encaminada a probar el protocolo empleado en yeguas repetidoras con historia previa de HAF. Estudios que podrían llevarse a cabo en colaboración con otros centros de reproducción con el objetivo de obtener el mayor número de datos posible. En esta línea se podría realizar la técnica de inyección por el flanco, ya que no requiere sonda transvaginal con canal de trabajo.

Por otro lado, sería lógico valorar la posibilidad de una vía de administración sistémica de prostaglandinas, ya que es una vía más accesible y económica para los veterinarios clínicos de campo. En esta línea, el principal reto sería determinar la dosis mínima efectiva de PGE2 y PGF2 $\alpha$  capaz de alcanzar las capas de la granulosa y la teca para inducir la ovulación con los mínimos efectos adversos.



## CONCLUSIONES

---

1. La administración de sulpirida cada 12 h a la dosis de 1.5 mg/Kg incrementa la concentración de prolactina a las 24 h del inicio del tratamiento. La hiperprolactinemia inducida con dicho tratamiento no tiene ningún efecto negativo sobre la tasa de ovulación.

2. La administración intrafolicular de 500 µg de PGE2 y 125 µg de PGF2α 32 h después de la administración de hCG induce la ovulación en yeguas tratadas con flunixin meglumine durante el periodo periovulatorio. Se asume la liberación normal y fértil del ovocito en dichas ovulaciones, ya que todas las yeguas inseminadas quedaron gestantes.

3. La administración intrafolicular de 500 µg de PGE2 y 125 µg de PGF2α en el estro temprano induce el colapso folicular dentro de las 12 h siguientes al tratamiento en la mayoría de las yeguas tratadas, pero dicho tratamiento no altera los perfiles de LH y estrógenos. En las 4 yeguas que respondieron a la administración de prostaglandinas dentro de las 12 h, las concentraciones de progesterona permanecieron bajas durante las 60 h siguientes al colapso folicular.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Advis JP & Ojeda SR** 1978 Hyperprolactinemia-induced precocious puberty in the female rat: ovarian site of action. *Endocrinology* **103** 924-935.
- Akil M, Amos RS & Stewart P** 1996 Infertility may sometimes be associated with NSAID consumption. *Br J Rheumatol* **35** 76-78.
- Akison LK & Robker RL** 2012 The critical roles of progesterone receptor (PGR) in ovulation, oocyte developmental competence and oviductal transport in mammalian reproduction. *Reprod Domest Anim* **47** Suppl 4 288-296.
- Aurich C** 2011 Reproductive cycles of horses. *Anim Reprod Sci* **124** 220-228.
- Bashir ST, Ishak GM, Gastal MO, Roser JF & Gastal EL** 2016 Changes in intrafollicular concentrations of free IGF-1, activin A, inhibin A, VEGF, estradiol, and prolactin before ovulation in mares. *Theriogenology*.doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.01.013
- Becker SE & Johnson AL** 1990 Failure of metoclopramide-induced acute hyperprolactinemia to affect time of ovulation or spontaneous luteolysis in the cycling mare. *Journal of Equine Veterinary Science* **10** 275-279.
- Bergfelt DR, Woods JA & Ginther OJ** 1992 Role of the embryonic vesicle and progesterone in embryonic loss in mares. *J Reprod Fertil* **95** 339-347.
- Besognet B, Hansen BS & Daels PF** 1997 Induction of reproductive function in anestrus mares using a dopamine antagonist. *Theriogenology* **47** 467-480.
- Boerboom D, Russell DL, Richards JS & Sirois J** 2003 Regulation of transcripts encoding ADAMTS-1 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like motifs-1) and progesterone receptor by human chorionic gonadotropin in equine preovulatory follicles. *J Mol Endocrinol* **31** 473-485.
- Brendemuehl JP & Cross DL** 2000 Influence of the dopamine antagonist domperidone on the vernal transition in seasonally anoestrous mares. *J Reprod Fertil Suppl* **56** 185-193.
- Burkhardt J** 1948 Some clinical problems of horse breeding. *Vet Rec* **60** 243-248.
- Cohen-Becker IR, Selmanoff M & Wise PM** 1986a Inhibitory effects of exogenously induced hyperprolactinemia on the endogenous cyclic release of luteinizing hormone and prolactin in the estrogen-primed ovariectomized rat. *Endocrinology* **119** 1718-1725.
- Cohen-Becker IR, Selmanoff M & Wise PM** 1986b Hyperprolactinemia alters the frequency and amplitude of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* **42** 328-333.

- Cuervo-Arango J & Newcombe JR** 2008 Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern in two consecutive cycles in the mare and how they are influenced by ovulation inductors. *Theriogenology* **69** 681-687.
- Cuervo-Arango J & Newcombe JR** 2009a The effect of hormone treatments (hCG and cloprostenol) and season on the incidence of hemorrhagic anovulatory follicles in the mare: a field study. *Theriogenology* **72** 1262-1267.
- Cuervo-Arango J & Newcombe JR** 2009b The effect of cloprostenol on the incidence of multiple ovulation and anovulatory hemorrhagic follicles in two mares: A case report. *Journal of Equine Veterinary Science* **29** 533-539.
- Cuervo-Arango J & Newcombe JR** 2010 Risk factors for the development of haemorrhagic anovulatory follicles in the mare. *Reprod Domest Anim* **45** 473-480.
- 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** 2011 The effect of treatment with flunixin meglumine at different times relative to hCG administration on ovulation failure and luteal function in mares. *Anim Reprod Sci* **127** 84-90.
- Cuervo-Arango J, Beg MA & Ginther OJ** 2011 Follicle and systemic hormone interrelationships during induction of luteinized unruptured follicles with a prostaglandin inhibitor in mares. *Theriogenology* **76** 361-373.
- Cuervo-Arango J** 2012 The effect of systemic administration of cloprostenol on ovulation in mares treated with a prostaglandin synthetase inhibitor. *Reprod Domest Anim* **47** 32-38.
- Cuervo-Arango J & Newcombe JR** 2012 Ultrasound characteristics of experimentally induced luteinized unruptured follicles (LUF) and naturally occurring hemorrhagic anovulatory follicles (HAF) in the mare. *Theriogenology* **77** 514-524.
- Cuervo-Arango J & Newcombe JR** 2013 Ultrasound confirmation of ovulation in mares: a normal corpus luteum or a haemorrhagic anovulatory follicle? *Reprod Domest Anim* **48** 105-111.
- Chavatte-Palmer P, Arnaud G, Duvaux-Ponter C, Brosse L, Bougel S, Daels P, Guillaume D, Clement F & Palmer E** 2002 Quantitative and qualitative assessment of milk production after pharmaceutical induction of lactation in the mare. *J Vet Intern Med* **16** 472-477.
- De Silva M & Reeves JJ** 1985 Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. *J Reprod Fertil* **75** 547-549.

- Donadeu FX & Ginther OJ** 2002 Changes in concentrations of follicular fluid factors during follicle selection in mares. *Biol Reprod* **66** 1111-1118.
- Donadeu FX & Thompson DL, Jr.** 2002 Administration of sulpiride to anovulatory mares in winter: effects on prolactin and gonadotropin concentrations, ovarian activity, ovulation and hair shedding. *Theriogenology* **57** 963-976.
- Doyle LK, Hogg CO, Watson ED & Donadeu FX** 2008 Seasonal effects on the response of ovarian follicles to IGF1 in mares. *Reproduction* **136** 589-598.
- Duffy DM & Stouffer RL** 2003 Luteinizing hormone acts directly at granulosa cells to stimulate periovulatory processes: modulation of luteinizing hormone effects by prostaglandins. *Endocrine* **22** 249-256.
- Evans WS, Cronin MJ & Thorner MO** 1982 Hypogonadism in hyperprolactinemia: proposed mechanisms. In *Frontiers in neuroendocrinology*. New York, **7** 77-122.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A & Nagy G** 2000 Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* **80** 1523-1631.
- Galli C, Duchi R, Colleoni S, Lagutina I & Lazzari G** 2014 Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology* **81** 138-151.
- Gastal EL, Kot K & Ginther OJ** 1995 Ultrasound-guided intrafollicular treatment in mares. *Theriogenology* **44** 1027-1037.
- Gastal EL, Gastal MO, Bergfelt DR & Ginther OJ** 1997 Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. *Biol Reprod* **57** 1320-1327.
- Gastal EL, Gastal MO & Ginther OJ** 1998 The suitability of echotexture characteristics of the follicular wall for identifying the optimal breeding day in mares. *Theriogenology* **50** 1025-1038.
- Gastal EL, Gastal MO, Wiltbank MC & Ginther OJ** 1999 Follicle deviation and intrafollicular and systemic estradiol concentrations in mares. *Biol Reprod* **61** 31-39.
- Gastal EL, Gastal MO, Nogueira GP, Bergfelt DR & Ginther OJ** 2000 Temporal interrelationships among luteolysis, FSH and LH concentrations and follicle deviation in mares. *Theriogenology* **53** 925-940.
- Gastal EL, Gastal MO & Ginther OJ** 2006a Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Reproduction* **131** 699-709.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gastal EL, Gastal MO & Ginther OJ** 2006b Serrated granulosa and other discrete ultrasound indicators of impending ovulation in mares. *J Equine Vet Sci* **26** 67-73.
- Gaytan F, Tarradas E, Bellido C, Morales C & Sanchez-Criado JE** 2002 Prostaglandin E(1) inhibits abnormal follicle rupture and restores ovulation in indomethacin-treated rats. *Biol Reprod* **67** 1140-1147.
- Ginther OJ** 1979 *Reproductive biology of the mare: Basic and Applied Aspects*. Cross Plains, Wisconsin: Equiservices Publishing.
- Ginther OJ & Pierson RA** 1989 Regular and irregular characteristics of ovulation and the interovulatory interval in mares. *J Equine Vet Sci* **9** 4-12.
- Ginther OJ** 1992 *Reproductive biology of the mare. Basic and Applied Aspects*. Cross Plains, Wisconsin: Equiservices Publishing
- Ginther OJ** 1995 *Ultrasonic imaging and animal reproduction*. Cross Plains, Wisconsin: Equiservices Publishing.
- Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO & Beg MA** 2005 Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. *Biol Reprod* **73** 315-323.
- Ginther OJ, Utt MD, Bergfelt DR & Beg MA** 2006a Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. *Anim Reprod Sci* **95** 144-150.
- Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO & Beg MA** 2006b Conversion of a viable preovulatory follicle into a hemorrhagic anovulatory follicle in mares. *Anim Reprod* **3** 29-40.
- Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO & Beg MA** 2007a Incidence, endocrinology, vascularity, and morphology of haemorrhagic anovulatory follicles in mares. *J Equine Vet Sci* **27** 130-139.
- Ginther OJ, Utt MD, Beg MA, Gastal EL & Gastal MO** 2007b Negative effect of estradiol on luteinizing hormone throughout the ovulatory luteinizing hormone surge in mares. *Biol Reprod* **77** 543-550.
- Ginther OJ, Gastal EL & Gastal MO** 2007c Spatial Relationships between Serrated Granulosa and Vascularity of the Preovulatory Follicle and Developing Corpus Luteum. *J Equine Vet Sci* **27** 20-27.
- Ginther OJ, Jacob JC, Gastal MO, Gastal EL & Beg MA** 2008a Follicle and systemic hormone interrelationships during spontaneous and ablation-induced ovulatory waves in mares. *Anim Reprod Sci* **106** 181-187.
- Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO & Beg MA** 2008b Dynamics of the equine preovulatory follicle and periovulatory hormones: What's new? *J Equine Vet Sci* **28** 454-460.
- Ginther OJ, Gastal MO, Gastal EL, Jacob JC & Beg MA** 2008c Induction of haemorrhagic anovulatory follicles in mares. *Reprod Fertil Dev* **20** 947-954.



- Ginther OJ & Al-Mamun M** 2009 Increased Frequency of Double Ovulations after Induction of Luteolysis with Exogenous Prostaglandin F<sub>2α</sub>. *J Equine Vet Sci* **29** 581–583.
- Ginther OJ, Beg MA, Gastal EL, Gastal MO & Cooper DA** 2009 Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17β-estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. *Anim Reprod Sci* **114** 311-317.
- Ginther OJ, Cuervo-Arango J & Beg MA** 2011 Disruption of periovulatory FSH and LH surges during induced anovulation by an inhibitor of prostaglandin synthesis in mares. *Anim Reprod Sci* **126** 91-95.
- Ginther OJ, Pinaffi FL, Silva LA & Beg MA** 2012a Temporal relationships of a pulse of prolactin (PRL) to a pulse of a metabolite of PGF<sub>2α</sub> in mares. *Theriogenology* **77** 99-107.
- Ginther OJ, Pinaffi FL, Rodriguez MB, Duarte LF & Beg MA** 2012b Stimulatory effect of PGF<sub>2α</sub> on PRL based on experimental inhibition of each hormone in mares. *Theriogenology* **78** 1960-1968.
- Giorgi M, Mehmet O, Camilo F & Panzani D** 2013 Pharmacokinetics of sulpiride after intravenous, intramuscular, and oral single-dose administration in nurse mares. *J Equine Vet Sci* **33** 533-538.
- Guillaume D, Chavatte-Palmer P, Combarous Y, Duchamp G, Martinat N, Nagy P & Daels PF** 2003 Induced lactation with a dopamine antagonist in mares: different responses between ovariectomized and intact mares. *Reprod Domest Anim* **38** 394-400.
- Hayashi KG, Matsui M, Acosta TJ, Kida K & Miyamoto A** 2006 Effect of the dominant follicle aspiration before or after luteinizing hormone surge on the corpus luteum formation in the cow. *J Reprod Dev* **52** 129-135.
- Hayes KE, Pierson RA, Scraba ST & Ginther OJ** 1985 Effects of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. *Theriogenology* **24** 465-477.
- Hinrichs K, Kenney DF & Kenney RM** 1990 Aspiration of oocytes from mature and immature preovulatory follicles in the mare. *Theriogenology* **34** 107-112.
- Hinrichs K, Rand WM & Palmer E** 1991 Effect of aspiration of the preovulatory follicle on luteinization, corpus luteum function, and peripheral plasma gonadotropin concentrations in the mare. *Biol Reprod* **44** 292-298.
- Hinrichs K** 2013 Assisted reproduction techniques in the horse. *Reprod Fertil Dev* **25** 80-93.
- Irvine CH, Turner JE, Alexander SL, Shand N & van Noordt S** 1998 Gonadotrophin profiles and dioestrous pulsatile release patterns in mares as determined by collection of jugular blood at 4 h intervals throughout an oestrous cycle. *J Reprod Fertil* **113** 315-322.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Jochle W, Irvine CH, Alexander SL & Newby TJ** 1987 Release of LH, FSH and GnRH into pituitary venous blood in mares treated with a PGF analogue, luprostirol, during the transition period. *J Reprod Fertil (Suppl)* **35** 261-267.
- Johnson AL** 1986 Serum concentrations of prolactin, thyroxine and triiodothyronine relative to season and the estrous cycle in the mare. *J Anim Sci* **62** 1012-1020.
- Johnson AL & Becker SE** 1987 Effects of physiologic and pharmacologic agents on serum prolactin concentrations in the nonpregnant mare. *J Anim Sci* **65** 1292-1297.
- Katz E** 1988 The luteinized unruptured follicle and other ovulatory dysfunctions. *Fertil Steril* **50** 839-850.
- Killick S & Elstein M** 1987 Pharmacologic production of luteinized unruptured follicles by prostaglandin synthetase inhibitors. *Fertil Steril* **47** 773-777.
- King WA, Bezaud J, Bousquet D, Palmer E & Betteridge KJ** 1987 The meiotic stage of preovulatory oocytes in mares. *Genome* **29** 679-682.
- Klemcke HG, Bartke A & Borer KT** 1984 Regulation of testicular prolactin and luteinizing hormone receptors in golden hamsters. *Endocrinology* **114** 594-603.
- Knudsen O & Velle W** 1961 Ovarian oestrogen levels in the non-pregnant mare: relationship to histological appearance of the uterus and to clinical status. *J Reprod Fertil* **2** 130-137.
- Korosue K, Murase H, Sato F, Ishimaru M, Harada T, Watanabe G, Taya K & Nambo Y** 2012 Successful induction of lactation in a barren Thoroughbred mare: growth of a foal raised on induced lactation and the corresponding maternal hormone profiles. *J Vet Med Sci* **74** 995-1002.
- Koskimies AI, Liukkonen S, Tenhunen A & Huhtaniemi I** 1987 Low LH receptor content in corpora lutea in luteinized unruptured follicle (LUF) syndrome. *Hum Reprod* **2** 367-369.
- Koskinen E, Kuntsi H, Lindeberg H & Katila T** 1989 Predicting ovulation in the mare on the basis of follicular growth and serum oestrone sulphate and progesterone levels. *Zentralbl Veterinarmed A* **36** 299-304.
- LeMaire GS** 1987 The luteinized unruptured follicle syndrome: anovulation in disguise. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* **16** 116-120.
- Li Q, Jimenez-Krassel F, Kobayashi Y, Ireland JJ & Smith GW** 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** 533-543.

- Li Q, Jimenez-Krassel F, Ireland JJ & Smith GW** 2009 Gene expression profiling of bovine preovulatory follicles: gonadotropin surge and prostanoid-dependent up-regulation of genes potentially linked to the ovulatory process. *Reproduction* **137** 297-307.
- Lin KC, Okamura H & Mori T** 1987 Inhibition of human chorionic gonadotropin-induced ovulation and steroidogenesis by short-term hyperprolactinemia in female rabbits. *Endocrinol Jpn* **34** 675-683.
- Lin KC, Kawamura N, Okamura H & Mori T** 1988 Inhibition of ovulation, steroidogenesis and collagenolytic activity in rabbits by sulpiride-induced hyperprolactinaemia. *J Reprod Fertil* **83** 611-618.
- Luo T, Bertone JJ, Greene HM & Wickler SJ** 2006 A comparison of N-butylscopolammonium and lidocaine for control of rectal pressure in horses. *Vet Ther* **7** 243-248.
- Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Jr., Shyamala G, Conneely OM & O'Malley BW** 1995 Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* **9** 2266-2278.
- Mari G, Morganti M, Merlo B, Castagnetti C, Parmeggiani F, Govoni N, Galeati G & Tamanini C** 2009 Administration of sulpiride or domperidone for advancing the first ovulation in deep anestrous mares. *Theriogenology* **71** 959-965.
- Marik J & Hulka J** 1978 Luteinized unruptured follicle syndrome: a subtle cause of infertility. *Fertil Steril* **29** 270-274.
- Markosyan N & Duffy DM** 2009 Prostaglandin E2 acts via multiple receptors to regulate plasminogen-dependent proteolysis in the primate periovulatory follicle. *Endocrinology* **150** 435-444.
- McCann JS, Caudle AB, Thompson FN, Stuedemann JA, Heusner GL & Thompson DL, Jr.** 1992 Influence of endophyte-infected tall fescue on serum prolactin and progesterone in gravid mares. *J Anim Sci* **70** 217-223.
- McCue PM & Squires EL** 2002 Persistent anovulatory follicles in the mare. *Theriogenology* **58** 541-543.
- McCue PM & McKinnon AO** 2011 Ovarian abnormalities. In *Equine Reproduction*. United Kingdom: Blackwell Publishing, **2** 2123-2136.
- Meinecke B, Gips H & Meinecke-Tillmann S** 1987 Progestagen, androgen and oestrogen levels in plasma and ovarian follicular fluid during the oestrous cycle of the mare. *Anim Reprod Sci* **12** 255-265.
- Melrose PA, Walker RF & Douglas RH** 1990 Dopamine in the cerebrospinal fluid of prepubertal and adult horses. *Brain Behav Evol* **35** 98-106.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Metcalf ES & Roser JF** 2010 The relationship between prolactin and cortisol levels and the formation of anovulatory follicles in the mare. *Anim Reprod Sci (Suppl)* **121** 54-55.
- Molitch ME** 2010 Pituitary gland: can prolactinomas be cured medically? *Nat Rev Endocrinol* **6** 186-188.
- Mozzaquatro FD, Verstegen JP, Douglas RH, Troedsson MH, DeLaCorte FD, Silva CA & Rubin MI** 2010 Luteal function induced by transvaginal ultrasonic-guided follicular aspiration in mares. *Anim Reprod Sci* **119** 56-62.
- Murdoch WJ, Peterson TA, Van Kirk EA, Vincent DL & Inskeep EK** 1986 Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biol Reprod* **35** 1187-1194.
- Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK & McIntush EW** 2000 Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* **80** 1-29.
- Ota H, Wakizaka A & Fukushima M** 1986 Modulation of ovarian LH receptor and serum hormone levels in rats with hyperprolactinemia induced by administration of ovine prolactin or sulpiride. *Tohoku J Exp Med* **148** 213-227.
- Palmer E & Terqui M** 1977 The measurement of total plasma oestrogens during the follicular phase of the mare's oestrous cycle. *Theriogenology* **7** 331-338.
- Palmer E** 1978 Control of the oestrous cycle of the mare. *J Reprod Fertil* **54** 495-505.
- Panzani D, Zicchino I, Taras A, Marmorini P, Crisci A, Rota A & Camillo F** 2011 Clinical use of dopamine antagonist sulpiride to advance first ovulation in transitional mares. *Theriogenology* **75** 138-143.
- Pierson RA & Ginther OJ** 1985a Ultrasonic evaluation of the preovulatory follicle in the mare. *Theriogenology* **24** 359-368.
- Pierson RA & Ginther OJ** 1985b Ultrasonic evaluation of the corpus luteum of the mare. *Theriogenology* **23** 795-806.
- Pinaffi FL, Khan FA, Silva LA, Beg MA & Ginther OJ** 2012 Ovarian and PGF<sub>2</sub>α responses to stimulation of endogenous PRL pulses during the estrous cycle in mares. *Theriogenology* **78** 1252-1261.
- Qublan H, Amarin Z, Nawasreh M, Diab F, Malkawi S, Al-Ahmad N & Balawneh M** 2006 Luteinized unruptured follicle syndrome: incidence and recurrence rate in infertile women with unexplained infertility undergoing intrauterine insemination. *Hum Reprod* **21** 2110-2113.
- Rajaniemi HJ, Ronnberg L, Kauppila A, Ylostalo P, Jalkanen M, Saastamoinen J, Selander K, Pystynen P & Vihko R** 1981 Luteinizing hormone receptors in human ovarian follicles

- and corpora lutea during menstrual cycle and pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* **52** 307-313.
- Rathwell AC, Asbury AC, Hansen PJ & Archbald LF** 1987 Reproductive function of mares given daily injections of prostaglandin F<sub>2</sub>alpha beginning at day 42 of pregnancy. *Theriogenology* **27** 621-630.
- Regan L, Owen EJ & Jacobs HS** 1990 Hypersecretion of luteinising hormone, infertility, and miscarriage. *Lancet* **336** 1141-1144.
- Risma KA, Clay CM, Nett TM, Wagner T, Yun J & Nilson JH** 1995 Targeted overexpression of luteinizing hormone in transgenic mice leads to infertility, polycystic ovaries, and ovarian tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** 1322-1326.
- Robker RL, Russell DL, Yoshioka S, Sharma SC, Lydon JP, O'Malley BW, Espey LL & Richards JS** 2000a Ovulation: a multi-gene, multi-step process. *Steroids* **65** 559-570.
- Robker RL, Russell DL, Espey LL, Lydon JP, O'Malley BW & Richards JS** 2000b Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** 4689-4694.
- Robker RL, Akison LK & Russell DL** 2009 Control of oocyte release by progesterone receptor-regulated gene expression. *Nucl Recept Signal* **7** e012.
- Roser JF, O'Sullivan J, Evans JW, Swedlow J & Papkoff H** 1987 Episodic release of prolactin in the cyclic mare. *J Reprod Fertil (Suppl)* **35** 687-688.
- Roser JF, Dudan F, Little TV, Livesay-Wilkins P & Hillman RB** 1989 Plasma prolactin concentrations in mares and their neonates after oxytocin induction of parturition. *Domest Anim Endocrinol* **6** 101-110.
- Russell DL & Robker RL** 2007 Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update* **13** 289-312.
- Salhab AS, Amro BI & Shomaf MS** 2003 Further investigation on meloxicam contraceptive in female rabbits: luteinizing unruptured follicles, a microscopic evidence. *Contraception* **67** 485-489.
- Schauer SN, Briant C, Ottogalli M, Decourt C, Handel IG & Donadeu FX** 2011 Supplementation of equine early spring transitional follicles with luteinizing hormone stimulates follicle growth but does not restore steroidogenic activity. *Theriogenology* **75** 1076-1084.
- Schauer SN, Guillaume D, Decourt C, Watson ED, Briant C & Donadeu FX** 2013 Effect of luteinizing hormone overstimulation on equine follicle maturation. *Theriogenology* **79** 409-416.

- Siddiqui MA, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA & Ginther OJ** 2009 Effect of HCG in the presence of HCG antibodies on the follicle, hormone concentrations, and oocyte in mares. *Reprod Domest Anim* **44** 474-479.
- Sirois J & Dore 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** 4427-4434.
- 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. *J Anim Sci* **50** 490-495.
- Stone S, Khamashta MA & Nelson-Piercy C** 2002 Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and reversible female infertility: is there a link? *Drug Saf* **25** 545-551.
- Thompson DL, Jr., Johnson L, St George RL & Garza F, Jr.** 1986 Concentrations of prolactin, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in pituitary and serum of horses: effect of sex, season and reproductive state. *J Anim Sci* **63** 854-860.
- Thompson DL, Jr., Garza F, Jr., St George RL, Rabb MH, Barry BE & French DD** 1991 Relationships among LH, FSH and prolactin secretion, storage and response to secretagogue and hypothalamic GnRH content in ovariectomized pony mares administered testosterone, dihydrotestosterone, estradiol, progesterone, dexamethasone or follicular fluid. *Domest Anim Endocrinol* **8** 189-199.
- Thompson DL, Jr., Hoffman R & DePew CL** 1997 Prolactin administration to seasonally anestrous mares: reproductive, metabolic, and hair-shedding responses. *J Anim Sci* **75** 1092-1099.
- Toutain PL, Autefage A, Legrand C & Alvinerie M** 1994 Plasma concentrations and therapeutic efficacy of phenylbutazone and flunixin meglumine in the horse: pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling. *J Vet Pharmacol Ther* **17** 459-469.
- Townson DH & Ginther OJ** 1987 Duration and pattern of follicular evacuation during ovulation in the mare. *Anim Reprod Sci* **15** 131-138.
- Townson DH, Pierson RA & Ginther OJ** 1989 Characterization of plasma progesterone concentrations for two distinct luteal morphologies in mares. *Theriogenology* **32** 197-204.
- Tsafiriri A, Lindner HR, Zor U & Lamprecht SA** 1972 Physiological role of prostaglandins in the induction of ovulation. *Prostaglandins* **2** 1-10.
- Wallach EE, Bronson R, Hamada Y, Wright KH & Stevens VC** 1975 Effectiveness of prostaglandin f 2 alpha in restoration of HMG-HCG induced ovulation in indomethacin-treated rhesus monkeys. *Prostaglandins* **10** 129-138.

- Watson ED & Sertich PL** 1991 Concentrations of arachidonate metabolites, steroids and histamine in preovulatory horse follicles after administration of human chorionic gonadotrophin and the effect of intrafollicular injection of indomethacin. *J Endocrinol* **129** 131-139.
- Worthy K, Escreet R, Renton JP, Eckersall PD, Douglas TA & Flint DJ** 1986 Plasma prolactin concentrations and cyclic activity in pony mares during parturition and early lactation. *J Reprod Fertil* **77** 569-574.
- Worthy K, Colquhoun K, Escreet R, Dunlop M, Renton JP & Douglas TA** 1987 Plasma prolactin concentrations in non-pregnant mares at different times of the year and in relation to events in the cycle. *J Reprod Fertil Suppl* **35** 269-276.
- Yoshimura Y, Nakamura Y, Oda T, Ando M, Ubukata Y, Koyama N, Karube M & Yamada H** 1992 Effects of prolactin on ovarian plasmin generation in the process of ovulation. *Biol Reprod* **46** 322-327.
- Yoshimura Y, Jinno M, Oda T, Shiokawa S, Yoshinaga A, Hanyu I, Akiba M & Nakamura Y** 1994 Prolactin inhibits ovulation by reducing ovarian plasmin generation. *Biol Reprod* **50** 1223-1230.
- Zagrajczuk A & Okolski A** 2010 Hyperprolactinemia as a cause of ovulation failure in mares. *Reprod Domest Anim (Suppl)* **45** 62.





# ANEXO

---



## ARTÍCULO I





## Original Research

# The Effect of Sulpiride Treatment During the Periovolulatory Period on Prolactin Concentration and Ovulation in the Mare



Rebeca Martínez-Boví LV<sup>a</sup>, Agata Zagrajczuk DVM, PhD<sup>b</sup>, Rosana Domingo-Ortiz LV, PhD<sup>a</sup>, Juan Cuervo-Arango DVM, MSc, PhD, Dipl ECAR<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad CEU Cardenal Herrera, Alfara del Patriarca, Valencia, Spain

<sup>b</sup> Department of Animal Reproduction, Agricultural University of Krakow, Krakow, Poland

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 24 March 2014

Received in revised form 17 June 2014

Accepted 24 June 2014

Available online 30 June 2014

## Keywords:

Mare  
Ovulatory season  
Sulpiride  
Prolactin  
Ovulation

## ABSTRACT

Sixteen estrous cycles from 10 cyclic mares were randomly assigned to a control or sulpiride group (n = 8 each). All mares received 1,500 IU of human chorionic gonadotropin (hCG) (hour 0) during estrus with a follicular diameter  $\geq 32$  mm. Mares were scanned every 12 hours until ovulation. In the treatment group, beginning at hour 0, each mare received 1.5 mg/kg of sulpiride every 12 hours intra-muscularly until ovulation or formation of a luteinized unruptured follicle (LUF). Concentrations of luteinizing hormone (LH) and prolactin (PRL) were measured by radioimmunoassay. In each group, there were 10 preovulatory follicles for the eight cycles. The ovulation rate (9/10, 90%) was similar in the control and sulpiride groups. Two mares formed an LUF, which was first detected at hours 48 and 72 for the sulpiride and control mares, respectively. The interval from hCG to ovulation was  $49.5 \pm 11.1$  and  $43.5 \pm 5.8$  hours, for the control and sulpiride groups, respectively ( $P > .5$ ). LH followed the typical preovulatory surge pattern, with no difference between groups ( $P > .5$ ). Sulpiride administration increased PRL concentration in treated mares at 24 ( $P < .1$ ), 36, and 48 hours ( $P < .05$ ) after treatment. In conclusion, sulpiride administration every 12 hours increased PRL concentration in treated mares after 24 hours of the beginning of treatment. However, at this time window and concentration, PRL did not have any effect on ovulation. The control mare that developed an LUF had a PRL concentration similar to other ovulatory control mares (always  $\leq 10$  ng/mL).

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Ovulation is a complex process of molecular mechanisms that involves a cascade of events that lead to the degradation and rupture of the follicle at its apex, and eventually, release of the oocyte and follicle collapse. Therefore, ovulation is an essential step in the process of fertilization. The first signal that triggers this cascade of

events is the preovulatory increase in luteinizing hormone (LH) concentration in peripheral blood circulation. Much of the knowledge and understanding of these molecular mechanisms has been obtained from experiments with laboratory animals and has been reviewed [1].

From all molecular factors involved in ovulation, the enzyme prostaglandin G/H synthase-2 (PGHS-2) present in granulosa cells and its products prostaglandins  $F_{2\alpha}$  and  $E_2$  in follicular fluid have been extensively studied in laboratory animals [2], women [3], cows [4], ewes [5], and mares [6,7]. In all these species, the blockade of PGHS-2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs during the periovolulatory period inhibited ovulation in a large percentage of treated females and induced the formation of luteinized

\* Corresponding author at: Juan Cuervo-Arango, DVM, MSc, PhD, Dipl ECAR, Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad CEU Cardenal Herrera, 46115 Alfara del Patriarca, Valencia, Spain.

E-mail address: [juan.cuervo@uch.ceu.es](mailto:juan.cuervo@uch.ceu.es) (J. Cuervo-Arango).

unruptured follicles (LUFs). In mares, as well as in other species, these LUFs are known to produce actively progesterone despite of not having released the oocyte [7]. Subsequently, the mare enters a diestrous-like phase, which lasts the same as in ovulatory mares with corpora lutea [7]. The experimentally induced LUF has been shown to share similar ultrasound and hormonal characteristics with the hemorrhagic anovulatory follicle (HAF) syndrome [8], the most common pathologic anovulatory condition that occurs spontaneously in mares [9,10].

Prolactin (PRL) has also been considered to be relevant to the ovulatory process. However, the exact role as how it is able to block ovulation is not totally understood. In rabbits, the perfusion of ovaries, with large quantities of PRL during the periovulatory period (at the same time of human chorionic gonadotropin [hCG] treatment), blocked ovulation by reducing ovarian generation of plasmin [11,12]. Plasmin, along with other serine proteases, contributes to the process of follicle wall degradation by activating latent collagenases, resulting in the disruption of collagenous connective tissue in the follicle [13]. In another approach to induce hyperprolactinemia, the treatment of rabbits with sulpiride, a dopamine antagonist, reduced significantly the ovulation rate and collagenolytic activity [14]. In contrast, hyperprolactinemia in women seems to induce anovulation by inhibiting Gonadotropin releasing hormone release and follicle growth rather than blocking the process of follicle wall degradation from matured pre-ovulatory follicles [15,16]. In mares, sulpiride has been used to advance the first ovulation of the year with no detrimental effect to the ovulation rate, despite the resultant increase in PRL concentration after the dopamine antagonist treatment [17,18]. On the other hand, the effect of sulpiride treatment during the periovulatory period in cyclic mares on ovulation has not been studied.

The aim of the present study was to determine the effect of sulpiride treatment on PRL concentration and ovulation during the periovulatory period (after induction of the LH surge with hCG) in cyclic mares.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals and Ultrasound Examinations of the Genital Tract

Ten mixed-breed cyclic mares aged 4–20 years old and weighing between 300 and 550 kg were used. The study was carried out during February and June in the northern hemisphere. Mares were kept stabled with access to ad libitum water and fed alfalfa hay and cereal grain. Animal procedures were handled in accordance with the Spanish Department of Agriculture Guide for Care and Use of Animals in Research.

Transrectal B-mode ultrasonography of the genital tract were performed using an ultrasound scanner (Sonosite 180 Vet Plus) equipped with a linear array 8-MHz transducer. All mares have had at least one ovulation by the time of the beginning of the study. This was confirmed by the presence of a corpus luteum (CL). Ultrasound examinations were performed every day during early estrus and twice a day at 12-hour intervals during the periovulatory period.

Endometrial edema was scored in a 0–5 scale. Follicular diameter was obtained using the electronic calipers from the average of two linear measurements of the antrum taken at right angles when the image of the follicle was at the largest.

The formation of an LUF was diagnosed when the follicle antrum filled gradually with echoic particles and the overall diameter and wall echogenicity increased. These echoic particles first moved freely during ballottement of the ovary and finally organized forming a network of echoic strands. The beginning of the formation of an LUF was considered equivalent to the day of ovulation.

### 2.2. Experimental Design and Hormonal Determination

A total of 10 mares were studied during 16 estrous cycles. Each estrous cycle was allocated to a control or a sulpiride treatment group. When the mare reached a follicle of  $\geq 32$  mm in diameter and showed mild-to-moderate endometrial edema ( $>2$  of 5), all mares received an IV treatment of 1,500 IU of hCG (Veterin Corion; Divasa Farmavic S.A., Spain). The time of hCG treatment was set at hour 0. In control ( $n = 8$ ) and sulpiride cycles ( $n = 8$ ), mares were scanned every 12 hours from hour 0 until ovulation or LUF formation. In the sulpiride cycles, beginning at hour 0, each mare received 1.5 mg/kg of sulpiride intra-muscularly (Dogmatil; 50 mg/mL; Sanofi Aventis S.A., Barcelona, Spain) every 12 hours, until ovulation or LUF formation. The interval from hCG administration to ovulation was calculated based on the ovulation and/or LUF formation of the first preovulatory follicle, if a mare had multiple ovulations.

Blood samples were taken every 12 hours from hour 0 until ovulation or LUF formation and placed into heparinized tubes from the jugular vein, immediately stored in ice and centrifuged ( $2,000 \times g$  for 10 minutes). In sulpiride-treated mares, samples were obtained just before sulpiride administration. The plasma was decanted and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until assayed. The LH and PRL concentrations were determined by homologous double-antibody radioimmunoassay (RIA), with highly purified equine hormones as standard of comparison and with specific antiserum raised against this standard. Equine, highly purified PRL (AFP-8794B), LH (AFP-5130A), and rat anti-ePRL (AFP-261987), as well as rabbit anti-eLH (AFP-240580), as primary antibodies for RIA were supplied by Dr Parlow (National Hormone & Peptide Program, Torrance, CA). The intra- and inter-assay coefficients of variation and mean sensitivity for PRL were 13.6%, 12.2%, and 0.2 ng/mL, respectively, and for LH were 11.0%, 13.4%, and 0.3 ng/mL, respectively.

### 2.3. Statistical Analysis

All data were normally distributed. Sequential data (LH and PRL concentrations over time) were analyzed by a general linear mixed model of variance with a repeated statement to account for autocorrelation between sequential observations of same individuals taken every 12 hours from hour 0 to ovulation and/or LUF formation (Systat 13; Systat Software Inc, Chicago, IL). If an effect of group, day, or group  $\times$  day interaction was found, the data were further tested by Student *t* test. A probability of  $P \leq .05$

indicated that a difference was significant and probabilities between  $P > .05$  and  $P \leq .1$  indicated that a difference approached significance. The effect of sulpiride treatment on the ovulation rate was determined by Fisher Exact test. Data are given as mean  $\pm$  standard deviation, unless stated otherwise.

### 3. Results

In each group, there were eight estrous cycles with a total of 10 preovulatory follicles. The follicular diameter at the time of hCG treatment was  $36.7 \pm 1.8$  and  $36.1 \pm 3.2$  for the control and sulpiride groups, respectively (Table 1). The interval from hCG to ovulation and/or LUF formation was  $49.5 \pm 11.1$  and  $43.5 \pm 5.8$  hours, for the control and sulpiride groups, respectively ( $P > .1$ ). There was a 90% ovulation rate in both groups (Table 1). In both groups, ovulating mares developed a morphologically normal CL as evidenced by ultrasound. One follicle from each group did not ovulate but filled with echic specks and luteinized forming an LUF. These luteinized follicles (evidenced by increased in the thickness and echodensity of the follicle wall) were first detected on hours 48 and 72 for the sulpiride and control mares, respectively.

Sulpiride treatment increased PRL concentration in treated mares compared with controls at 24 ( $P < .1$ ), 36, and 48 hours ( $P < .05$ ) after the beginning of the treatment (Fig. 1). There was an effect of group  $\times$  day interaction ( $P < .01$ ). This interaction originated from an increase in PRL concentration overtime in the sulpiride group, whereas the PRL concentration remained constant throughout the sampling period in the control group (Fig. 1). As mares ovulated at different times after hCG treatment, PRL and LH concentrations were also normalized to the hour of ovulation (Figs. 2 and 3, respectively). Prolactin concentration was higher in sulpiride-treated mares 24 hours ( $P < .1$ ) and 12 hours ( $P < .05$ ) before ovulation and just after ovulation ( $P < .05$ ). LH concentration followed the typical preovulatory surge pattern (Fig. 3), with no difference between groups ( $P > .1$ ).

### 4. Discussion

Treatment of cyclic mares with sulpiride during the periovulatory period (after hCG administration) increased PRL concentration after 24 hours of the beginning of the treatment. This result confirms the data reported by other authors in cyclic mares [19–21] and rabbits [14]. Other studies carried out in winter had similar results [17,18,22,23]. However, this increase in PRL concentration

within 24 hours of ovulation did not have any detrimental effect on follicle rupture as evidenced by ultrasound. In contrast, sulpiride-induced hyperprolactinemia reduced significantly the ovulation rate in rabbits [14]. In the latter study, ovulation was also induced by hCG. After the expected time of ovulation after hCG (by 14 hours of treatment), sulpiride-treated rabbits had a lower ovulation rate (61.5%) than control rabbits (84.1%). Other studies in the same species suggested that PRL inhibits ovulation, at least in part, by reducing ovarian plasmin generation [11,12]. In all these experiments with rabbits, there was no evidence of luteinization of follicles and no increase in progesterone concentration, that is LUF formation, as it is the case when prostaglandins are inhibited by indomethacin during the periovulatory period [24,25]. In the latter experiment [14], however, the difference in PRL concentration in treated rabbits compared with controls was much higher (11-fold increase) than that of the present study (2.5-fold to threefold increase). This difference might account for the lack of inhibitory effect of PRL on ovulation in sulpiride-treated mares.

The dose of 1.5 mg/kg (twice a day) was chosen on the basis that it was significantly higher (three to six times higher) than the dose reported in other studies to advance successfully the first ovulation of the year [17,23]. Nonetheless, the dose of 1.5 mg/kg bis in die (twice a day) or the duration of treatment (within 48 hours of ovulation) did not appear to be sufficient to alter the ovulation efficiency. However, when rabbit ovaries were perfused with PRL for only 12.5 hours (just before hCG treatment), ovulation rate was also lowered [24,25]. In addition, treatment of mares with flunixin meglumine every 12 hours from the moment of hCG administration was also sufficient to block ovulation in most of the mares [6]. Many factors involved in the digestion of the follicular wall leading to follicle rupture and collapse are activated not earlier than 24 to 10 hours before ovulation [1,26,27].

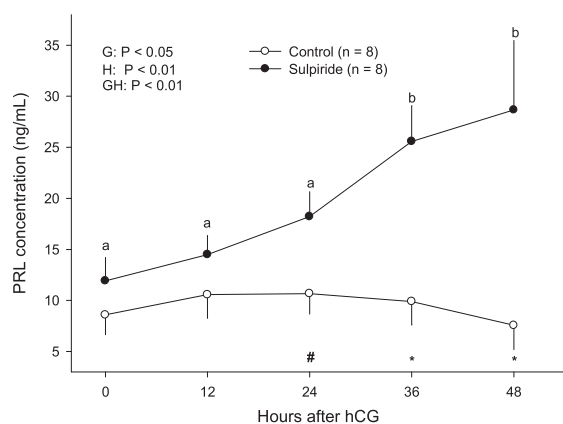
A recent study [28] found an association between the use of sulpiride in postpartum pony mares and a reduction in the ovulation rate. Five of nine mares (56%) underwent LUF formation after oral daily treatment of 750 mg of sulpiride per mare. In treated mares, PRL and LH concentrations at the time of ovulation and/or LUF were found to be around 2.5 times higher than those of controls. It is not clear whether the higher incidence of LUF in sulpiride-treated mares was because of increased PRL or LH concentrations. In addition, the bioavailability of sulpiride given orally is low (20.4%) compared with intramuscular treatment (118%) [29]. The occurrence of LUF has been linked to increased LH concentrations in mares [30,31]. In

**Table 1**  
Effect of sulpiride treatment on ovulation and luteinized unruptured follicle (LUF) formation

Group	n	Follicle Diameter at hCG (mm $\pm$ SD)	Interval From hCG to Ovulation/LUF				LUF Rate (%)
			24–36 hr	36–48 hr	48–72 hr	Mean Interval (hr)	
Control	8	36.7 $\pm$ 1.8	2/8 (25%)	4/8 (50%)	2 <sup>a</sup> /8 (25%)	49.5 $\pm$ 11.1	1/10 (10)
Sulpiride	8	36.1 $\pm$ 3.2	3/8 (37%)	5 <sup>a</sup> /8 (63%)	0/8 (0%)	43.5 $\pm$ 5.8	1/10 (10)

Abbreviations: hCG, human chorionic gonadotropin; SD, standard deviation. Each group had eight mares and 10 preovulatory follicles.

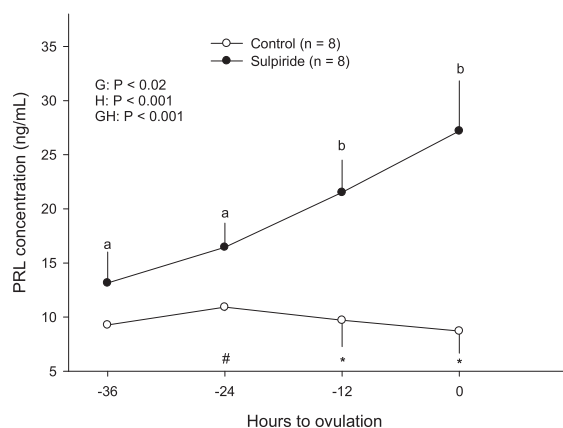
<sup>a</sup> Indicates the formation of an LUF at hours 72 and 48 for the control and sulpiride groups, respectively.



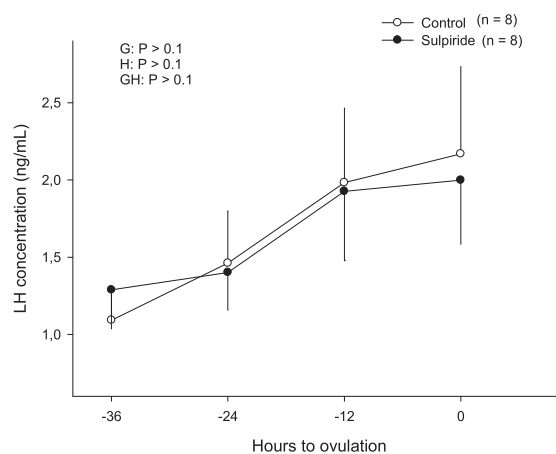
**Fig. 1.** Prolactin (PRL)  $\pm$  SEM concentration in sulpiride-treated and control mares after hCG administration. Sulpiride treatment increased PRL concentration at 24 hours (#,  $P < .1$ ), 36 hours, and 48 hours (\*,  $P < .05$ ) after the beginning of the treatment. In the sulpiride group, the first significant increase (a, b;  $P < .05$ ) in PRL concentration occurred between 24 and 36 hours after the beginning of the treatment. hCG, human chorionic gonadotropin; SEM, standard error of the mean.

contrast, one clinical study [32] reported no differences in mean PRL concentration (within 24 hours of ovulation and/or anovulation) between mares with normal ovulations (8.4 ng/mL) and those with HAFs (7.6 ng/mL). In the present study, only two mares developed an LUF. The control mare that developed an LUF had a PRL concentration similar to other ovulatory control mares (always  $\leq 10$  ng/mL), whereas the sulpiride-treated mare that developed an LUF had a PRL concentration (30.9 ng/mL) similar to other ovulatory mares from the treatment group (29.1 ng/mL).

In conclusion, sulpiride administration every 12 hours at 1.5 mg/kg increased PRL concentration in treated mares after 24 hours of the beginning of the treatment. However, at this time window and concentration, PRL did not have any detrimental effect on ovulation rate.



**Fig. 2.** Prolactin (PRL)  $\pm$  SEM concentration in sulpiride-treated and control mares normalized to the hour of ovulation (hour 0). Prolactin was higher in the sulpiride group 24 hours (#,  $P < .1$ ) and 12 hours before ovulation and just after ovulation (\*,  $P < .01$ ). Within group, a difference in PRL concentration between hours ( $P < .05$ ) is indicated by different letters (a, b). SEM, standard error of the mean.



**Fig. 3.** LH  $\pm$  SEM concentration in sulpiride-treated and control mares normalized to the hour of ovulation (hour 0). LH, luteinizing hormone; SEM, standard error of the mean.

## Acknowledgments

This study was funded by the Universidad CEU Cardenal Herrera in collaboration with the Banco Santander (Project ref. PRCEU-UCH-Santander 04/11). This article is intended to be part of the PhD thesis dissertation of R.M.B.

## References

- [1] Russell DL, Robker RL. Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update* 2007;13:289–312.
- [2] Gaytan F, Tarradas E, Bellido C, Morales C, Sanchez-Criado JE. Effects of selective inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase pathways in follicle rupture and ovulation in the rat. *Reproduction* 2006;132:571–7.
- [3] Killick S, Elstein M. Pharmacologic production of luteinized unruptured follicles by prostaglandin synthetase inhibitors. *Fertil Steril* 1987;47:773–7.
- [4] De Silva M, Reeves JJ. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. *J Reprod Fertil* 1985;75:547–9.
- [5] Murdoch WJ, Peterson TA, Van Kirk EA, Vincent DL, Inskeep EK. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biol Reprod* 1986;35:1187–94.
- [6] Cuervo-Arango J, Domingo-Ortiz R. Systemic treatment with high dose of flunixin-meglumine is able to block ovulation in mares by inducing hemorrhage and luteinisation of follicles. *Theriogenology* 2011;75:707–14.
- [7] Cuervo-Arango J, Beg MA, Ginther OJ. Follicle and systemic hormone interrelationships during induction of luteinized unruptured follicles with a prostaglandin inhibitor in mares. *Theriogenology* 2011;76:361–73.
- [8] Cuervo-Arango J, Newcombe JR. Ultrasound characteristics of experimentally induced luteinized unruptured follicles (LUF) and naturally occurring hemorrhagic anovulatory follicles (HAF) in the mare. *Theriogenology* 2012;77:514–24.
- [9] Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. Incidence, endocrinology, vascularity, and morphology of hemorrhagic anovulatory follicles in mares. *J Equine Vet Sci* 2007;27:130–9.
- [10] Cuervo-Arango J, Newcombe JR. Risk factors for the development of hemorrhagic anovulatory follicles (HAFs) in the mare. *Reprod Domest Anim* 2010;45:473–80.
- [11] Yoshimura Y, Nakamura Y, Oda T, Ando M, Ubukata Y, Koyama N, Yamada H. Effects of prolactin on ovarian plasmin generation in the process of ovulation. *Biol Reprod* 1992;46:322–7.
- [12] Yoshimura Y, Jinno M, Oda T, Shiokawa S, Yoshinaga A, Hanyu I, Nakamura Y. Prolactin inhibits ovulation by reducing ovarian plasmin generation. *Biol Reprod* 1994;50:1223–30.
- [13] Reich R, Miskin R, Tsafirni A. Follicular plasminogen activator: involvement in ovulation. *Endocrinology* 1985;115:516–21.



- [14] Lin KC, Kawamura N, Okamura H, Mori T. Inhibition of ovulation, steroidogenesis and collagenolytic activity in rabbits by sulpiride-induced hyperprolactinaemia. *J Reprod Fertil* 1988;83: 611–8.
- [15] Evans WS, Cronin MJ, Thorner MO. Hypogonadism in hyperprolactinemia: proposed mechanisms. In: Ganong WF, Martini L, editors. *Frontiers in neuroendocrinology*. New York, New York: Raven Press; 1982. p. 77–122.
- [16] Molitch ME. Pituitary gland: can prolactinomas be cured medically? *Nat Rev Endocrinol* 2010;6:186–8.
- [17] Besognet B, Hansen BS, Daels PF. Induction of reproductive function in anestrus mares using a dopamine antagonist. *Theriogenology* 1997;47:467–80.
- [18] Mitcham PB, Thompson Jr DL, Burns PJ, Gilley RM. Recent advances in the use of an estradiol-dopamine antagonist protocol to induce ovulation in seasonally anovulatory mares. *J Equine Vet Sci* 2014; 34(Suppl):105–6.
- [19] Guillaume D, Chavatte-Palmer P, Combarrous Y, Duchamp G, Martinat N, Nagy P, Daels PF. Induced lactation with a dopamine antagonist in mares: different responses between ovariectomized and intact mares. *Reprod Domest Anim* 2003;38:394–400.
- [20] Pinaffi FLV, Khan FA, Silva LA, Beg MA, Ginther OJ. Ovarian and PGF<sub>2α</sub> responses to stimulation of endogenous PRL pulses during the estrous cycle in mares. *Theriogenology* 2012;78:1252–61.
- [21] Johnson AL, Becker SE. Effects of physiologic and pharmacologic agents on serum prolactin concentrations in the nonpregnant mare. *J Anim Sci* 1987;65:1292–7.
- [22] Donadeu FX, Thompson Jr DL. Administration of sulpiride to anovulatory mares in winter: effects on prolactin and gonadotropin concentrations, ovarian activity, ovulation and hair shedding. *Theriogenology* 2002;57:963–76.
- [23] Mari G, Morganti M, Merlo B, Castagnetti C, Parmeggiani F, Govoni N, Galeati G, Tamanini C. Administration of sulpiride or domperidone for advancing the first ovulation in deep anestrous mares. *Theriogenology* 2009;71:959–65.
- [24] Lee W, Novy MJ. Effects of luteinizing hormone and indomethacin on blood flow and steroidogenesis in the rabbit ovary. *Biol Reprod* 1978;18:799–807.
- [25] Holmes PV, Janson PO, Sogn J, Källfelt B, LeMaire WJ, Ahrén KB, Cajander S, Bjersing L. Effects of PGF<sub>2</sub> alpha and indomethacin on ovulation and steroid production in the isolated perfused rabbit ovary. *Acta Endocrinol (copenh)* 1983;104:233–9.
- [26] Sirois J, Dore M. The late induction of prostaglandin G/H synthase-2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process. *Endocrinology* 1997;138:4427–34.
- [27] Boerboom D, Russell DL, Richards JS, Sirois J. Regulation of transcripts encoding ADAMTS-1 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like motifs-1) and progesterone receptor by human chorionic gonadotropin in equine preovulatory follicles. *J Mol Endocrinol* 2003;31:473–85.
- [28] Zagrajczuk A, Okólski A. Hyperprolactinemia as a cause of ovulation failure in mares. *Reprod Domest Anim* 2010;45(Suppl. 3): 62 (Abstract).
- [29] Giorgi M, Mehmet O, Camilo F, Panzani D. Pharmacokinetics of sulpiride after intravenous, intramuscular, and oral single-dose administration in nurse mares. *J Equine Vet Sci* 2013;33:533–8.
- [30] Ginther OJ, Jacob JC, Gastal MO, Gastal EL, Beg MA. Follicle and systemic hormone interrelationships during spontaneous and ablation-induced ovulatory waves in mares. *Anim Reprod Sci* 2008; 106:181–7.
- [31] Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Jacob JC, Beg MA. Induction of haemorrhagic anovulatory follicles in mares. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:947–54.
- [32] Metcalf ES, Roser JF. The relationship between prolactin and cortisol levels and the formation of anovulatory follicles in the mare. *Anim Reprod Sci* 2010;121(Suppl):54–5.



## ARTÍCULO II





# Intrafollicular treatment with prostaglandins PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub> inhibits the formation of luteinised unruptured follicles and restores normal ovulation in mares treated with flunixin-meglumine

R. MARTÍNEZ-BOVÍ and J. CUERVO-ARANGO\*

Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad CEU, Cardenal Herrera, Alfara del Patriarca, Spain.

\*Correspondence email: juan.cuervo@uch.ceu.es; Received: 06.10.14; Accepted: 26.11.14

## Summary

**Reasons for performing study:** Haemorrhagic anovulatory follicle is the most common pathological anovulatory condition in the mare, but its cause remains unknown. An experimental model to induce luteinised unruptured follicles (LUF) with flunixin-meglumine (FM) has been developed. Luteinised unruptured follicles share similar morphological and hormonal characteristics with haemorrhagic anovulatory follicles.

**Objectives:** To test the effect of intrafollicular administration of prostaglandins PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub> during the periovulatory period on ovulation and pregnancy in FM-treated mares.

**Study design:** *In vivo* experiment in a crossover design.

**Methods:** Five mares were followed during 2 oestrous cycles each. All mares were given FM at 1.7 mg/kg bwt i.v. every 12 h from Hour 0 (Hour 0 = human chorionic gonadotrophin treatment) to Hour 36. In treatment cycles (n = 5), at Hour 32 the preovulatory follicle was punctured and 0.5 ml of a solution containing 500 µg of PGE<sub>2</sub> and 125 µg of PGF<sub>2α</sub> was deposited within the follicle. In control cycles, water for injection was administered into the follicle at the same time. In 3 control and 3 treatment cycles, mares were also inseminated at Hour 24. Diagnosis of ovulation/LUF formation and pregnancy was performed by ultrasound examination between Hours 36 and 72 and 14 days after ovulation/LUF formation, respectively.

**Results:** During the treatment cycles, all mares ovulated normally (100% ovulation rate) 36–48 h after human chorionic gonadotrophin, while in 4 of 5 control cycles the mares developed an LUF (80%, P<0.05). All 3 inseminated mares became pregnant in the treatment cycles, but not in the control cycles.

**Conclusions:** Intrafollicular treatment with PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub> overcame the anovulatory effect of FM. This sheds new insights into the knowledge on the possible therapeutic options for ovulatory failure in the mare.

**Keywords:** horse; mare; luteinised unruptured follicle; prostaglandin; ovulation

## Introduction

Haemorrhagic anovulatory follicle (HAF) is a cause of ovulatory failure in the mare [1–5]. During the development of an HAF, the preovulatory-sized follicle fails to ovulate despite typical secondary signs associated with ovulation, such as the preovulatory surge and luteinising hormone (LH) peak, an abrupt decrease in oestradiol and a gradual increase in progesterone concentrations [2,6], decreasing endometrial oedema score [4,5] and normal length of the subsequent dioestrous phase [2,4]. Equine HAF fails to rupture but increases in diameter. Subsequently, the HAF wall thickens and becomes highly echoic, indicating active luteinisation [2]. Simultaneously, the follicular antrum fills with increasing amounts of echoic particles which move freely upon ballottement of the ovary. Eventually, the HAF contents organise. Although the overall incidence of HAF in the mare population is relatively low, 5–8% of all oestrous cycles [1,4,7], incidences can be as high as 25–50% of all cycles in individual mares, so-called 'repeater mares' [2,4] and is a cause of infertility in these mares.

The term luteinised unruptured follicle (LUF) syndrome has been used in human medicine to refer to a common cause of infertility in women who fail to rupture and ovulate their preovulatory follicle despite secondary ovulatory changes such as an LH peak, a rise in progesterone or secretory transformation of the endometrium [8–11]. Instead of ovulating and forming a typical *corpus luteum* (CL), the anovulatory follicle increases in diameter, fills with echoic particles and eventually luteinises with active production of progesterone [12,13]. As in equine spontaneous HAF, the natural occurrence of spontaneous LUF is difficult to predict. An experimental protocol that reliably allowed the induction of LUF in women consists of systemic administration of prostaglandin synthase inhibitors [14,15]. The ultrasonographic characteristics of both spontaneous and experimentally induced human LUF are similar [13,14], which might also indicate similar pathogenic mechanisms. Intrafollicular prostaglandins (PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub>)

are essential key factors for the ovulatory process in mammals [16]. They are actively produced in the granulosa cells approximately 10 h before ovulation [17].

Recently, the experimental protocol to induce LUF in women with prostaglandin synthase inhibitors [14] was successfully attempted in mares [18]. Flunixin-meglumine (FM), a prostaglandin synthase inhibitor, blocked ovulation during the expected periovulatory period in over 80% of treated mares. The resultant FM-induced anovulatory follicles underwent ultrasonographic signs of luteinisation and therefore were termed LUF [18]. Flunixin-meglumine-induced equine LUF share a similar profile of reproductive hormones [19] and ultrasound characteristics [20] to that reported for spontaneous HAF.

The treatment options for mares with HAF are limited [21]. The objectives of this study were to characterise the effect of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub> administered intrafollicularly in mares treated with FM on ovulation and pregnancy rate.

## Materials and methods

### Animals and ultrasound examinations

Five mixed-breed cyclic mares from the institute's research herd aged 5–18 years and weighing 350–550 kg were studied during 10 oestrous cycles (2 cycles each mare) in April–June 2014. Mares were kept stabled with *ad libitum* access to water and fed alfalfa hay and cereal grain.

Transrectal B-mode ultrasonography of the genital tract was performed using an ultrasound scanner (Sonosite nanomaxx)<sup>a</sup> equipped with a linear array 8 MHz probe. All mares had had at least one ovulation by the time of the beginning of the study. This was confirmed by the presence of a *corpus luteum*. Ultrasound examinations were performed every day from Day 15 (Day 0 = day of ovulation) and twice a day at 12 h intervals

during the periovarian period. Endometrial oedema was scored on a 0–3 scale (0 = dioestrus-like echotexture, with no endometrial folding; 3 = maximum degree of endometrial folding). The follicular diameter was obtained using electronic calipers from the average of 2 linear measurements of the antrum taken at right angles when the size of the follicle was maximal. An ovulation was diagnosed when the previous preovulatory follicle had disappeared with at least the loss of  $\geq 90\%$  of follicular fluid. The formation of an LUF was diagnosed when the follicle did not collapse but filled gradually with an increasing amount of echoic specks that moved freely during ballottement of the ovary. Finally, the LUF contents organised, forming a network of fibrin, as described previously [18].

### Experimental design and intrafollicular puncture

For each mare, 2 oestrous cycles, with a wash-out period of one cycle in between, were allocated randomly to a control ( $n = 5$ ) or to a treatment ( $n = 5$ ) group in a crossover design. The first cycle of 3 mares was a control cycle while the remaining 2 were treatment cycles. After Day 15 (Day 0 = day of previous ovulation), when the mares reached a follicle diameter  $\geq 32$  mm and showed mild to moderate endometrial oedema (score of 1–3), they were given 1500 iu of human chorionic gonadotrophin (hCG) i.v. (Veterin Corion)<sup>®</sup> to induce the preovulatory surge of LH. The time of hCG treatment was set as Hour 0. In all cycles (control and treatment), mares received flunixin-meglumine (Finadyne)<sup>®</sup> 1.7 mg/kg bwt i.v. every 12 h from Hour 0 to Hour 36 or until the diagnosis of ovulation/beginning of LUF formation, whichever came first. Three mares, in their treatment ( $n = 3$ ) and control ( $n = 3$ ) cycles, were inseminated with  $1 \times 10^6$  progressively motile fresh sperm from a stallion of proven fertility at Hour 24. The remaining 2 mares were not inseminated because of cervical lacerations and a history of post mating intrauterine fluid accumulation.

A mixed solution of naturally occurring PGE<sub>2</sub> (dinoprostone 10 mg/ml, PGE2-Pfizer)<sup>®</sup> and PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (5 mg/ml dinoprost, Dinolytic)<sup>®</sup> was prepared. This solution was used for each treatment cycle and contained 500  $\mu$ g PGE<sub>2</sub> and 125  $\mu$ g of PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  diluted in 0.5 ml of water for injection. Each mare received a single injection in the largest preovulatory follicle at Hour 32 of 0.5 ml of the treatment solution (treatment cycles) or placebo (0.5 ml of water for injection) during the control cycles by transvaginal ultrasound-guided follicular puncture. The follicular puncture was performed with the mare restrained in the stocks, previously sedated with detomidine hydrochloride 0.01 mg/kg bwt i.v. (Domosedan)<sup>®</sup> and butorphanol tartrate 0.02 mg/kg bwt i.v. (Torbugesic)<sup>®</sup>. The perineum was thoroughly cleansed.

Ultrasound-guided follicular puncture was performed using an ultrasound scanner (Honda Electronics HS-1500 VET)<sup>®</sup> equipped with a 9 MHz convex transvaginal transducer (HCV 3710MV). The transducer was introduced into the vagina and placed next to the side of the vaginal fornix ipsilateral to the ovary containing the target follicle. A 5 cm, 21 gauge needle was fitted to the end of the working channel of the ultrasound probe. The needle was connected through a silicone tube to a 1 ml-syringe containing the treatment or placebo solution. During the transvaginal ultrasound-guided follicle puncture, the needle was introduced into the follicular antrum while the ovary was held manually *per rectum*. Care was taken to avoid any excessive movement of the ovary during follicle puncture so that the wall was minimally damaged. The whole procedure was performed easily in <5 min. Mares were scanned transrectally just before and 15 min after follicle puncture to measure follicle diameter and to assess any loss of fluid due to follicle puncture.

Thereafter, mares were scanned at least at Hours 36, 48, 60 and 72. In addition, 2 mares in the treatment cycles were scanned every 2 h from Hour 36 to Hour 48 to determine more precisely the exact time of ovulation. A final ultrasound examination was performed 9 days after ovulation/beginning of LUF formation to evaluate and measure the *corpus luteum*/LUF. Pregnancy diagnosis was performed 14 days post ovulation/LUF formation. If a mare was diagnosed as pregnant in their first cycle, 5 mg of dinoprost was administered subcutaneously to induce luteolysis and the vesicle was crushed manually. This occurred in one of the 3 mares that conceived. The remaining 2 mares conceived in their last cycle.

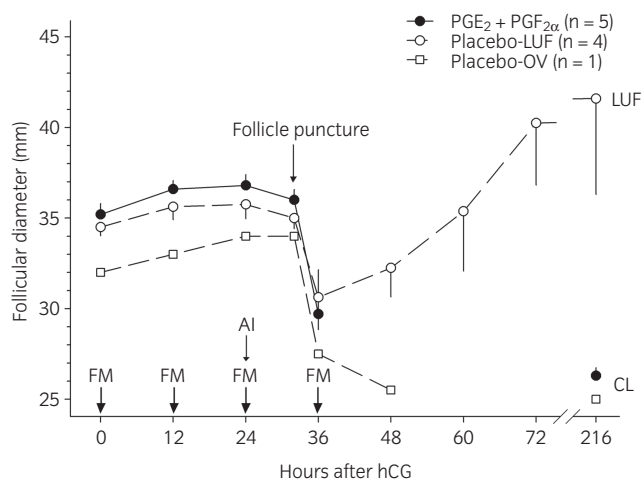


Fig 1: Mean  $\pm$  s.e.m. diameter of the largest preovulatory follicle in control ( $n = 5$ ) and treatment cycles ( $n = 5$ ). In all cycles, mares received 1500 iu of human chorionic gonadotrophin (hCG; Hour 0) and flunixin-meglumine 1.7 mg/kg bwt i.v. at the frequency indicated by arrows (FM). In 3 control and 3 treatment cycles, mares were artificially inseminated (AI) with fresh semen 24 h after hCG (arrow). In control cycles, the preovulatory follicle was injected with 0.5 ml of water for injection (Placebo;  $n = 5$ ) and in treatment cycles with 500  $\mu$ g PGE<sub>2</sub> and 125  $\mu$ g PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  in 0.5 ml of water 32 h after hCG (intrafollicular injection). In control cycles, 4 mares developed a luteinised unruptured follicle (Placebo-LUF) and one mare ovulated (Placebo-OV). All mares in the treatment cycles ( $n = 5$ ) ovulated and developed a *corpus luteum* (CL).

### Data analyses

Sequential data (follicle diameter) was tested for normality using the Anderson-Darling test. Data not normally distributed were ranked. Differences in follicle diameter between the control and treatment cycles were analysed by unpaired *t* test. Differences in endometrial score between the control and the treatment cycles were analysed by Mann-Whitney nonparametric test. Frequency data (ovulation/LUF formation rate) were analysed by Fisher's exact test (Minitab15)<sup>®</sup>. Statistical significance was set at  $P \leq 0.05$ . All images obtained during the ultrasound examinations were frozen, labelled and saved for further detailed analyses and creation of figures.

### Results

All 5 mares in the treatment cycles had a normal ovulation 36–48 h after hCG treatment (Fig 1). The ovulation rate (100%) in the treatment cycles was higher ( $P < 0.05$ ) than that of the control cycles (20%; 1/5). In the 2 treatment cycles monitored at 2 h intervals between Hour 36 and 48, the mares ovulated by Hour 40 (Fig 2) and 42 (8 and 10 h after intrafollicular treatment, respectively). In 4 control cycles, the preovulatory follicle did not collapse but developed into an LUF. The LUF showed a gradual increase in diameter from Hour 36 onwards (Fig 1) and follicle haemorrhage evidenced by the presence of echoic specks that moved freely upon ballottement of the ovary. Luteinisation of the follicle was evidenced by the increase in the thickness and echogenicity of the granulosa layer. Finally, the LUF contents organised, forming a network of echoic strands (Fig 3). In the control cycle that did not form an LUF, the follicle showed a gradual decrease in diameter between Hour 32 (34 mm) and Hour 48 (25.5 mm). The follicle of this mare collapsed at Hour 60 (Fig 4). Only one follicle from the treatment cycles developed signs of follicular haemorrhage before ovulation. In this cycle, the mare had a follicle with moderate signs of haemorrhage (echoic specks) at Hour 32 (before treatment), but then ovulated normally by Hour 48 (Fig 5).

The follicle puncture induced an immediate (within 15 min) reduction in diameter of  $2.1 \pm 1.2$  mm (range 0–5.5 mm) and  $3.7 \pm 1.7$  mm (range 0.5–10.5 mm) in the treatment and the control cycles, respectively. The preovulatory follicle diameter at Hour 36 (4 h after follicle puncture) was reduced by  $6.7 \pm 2.4$  (range 0.5–14 mm) and  $4.8 \pm 1.9$  mm (range

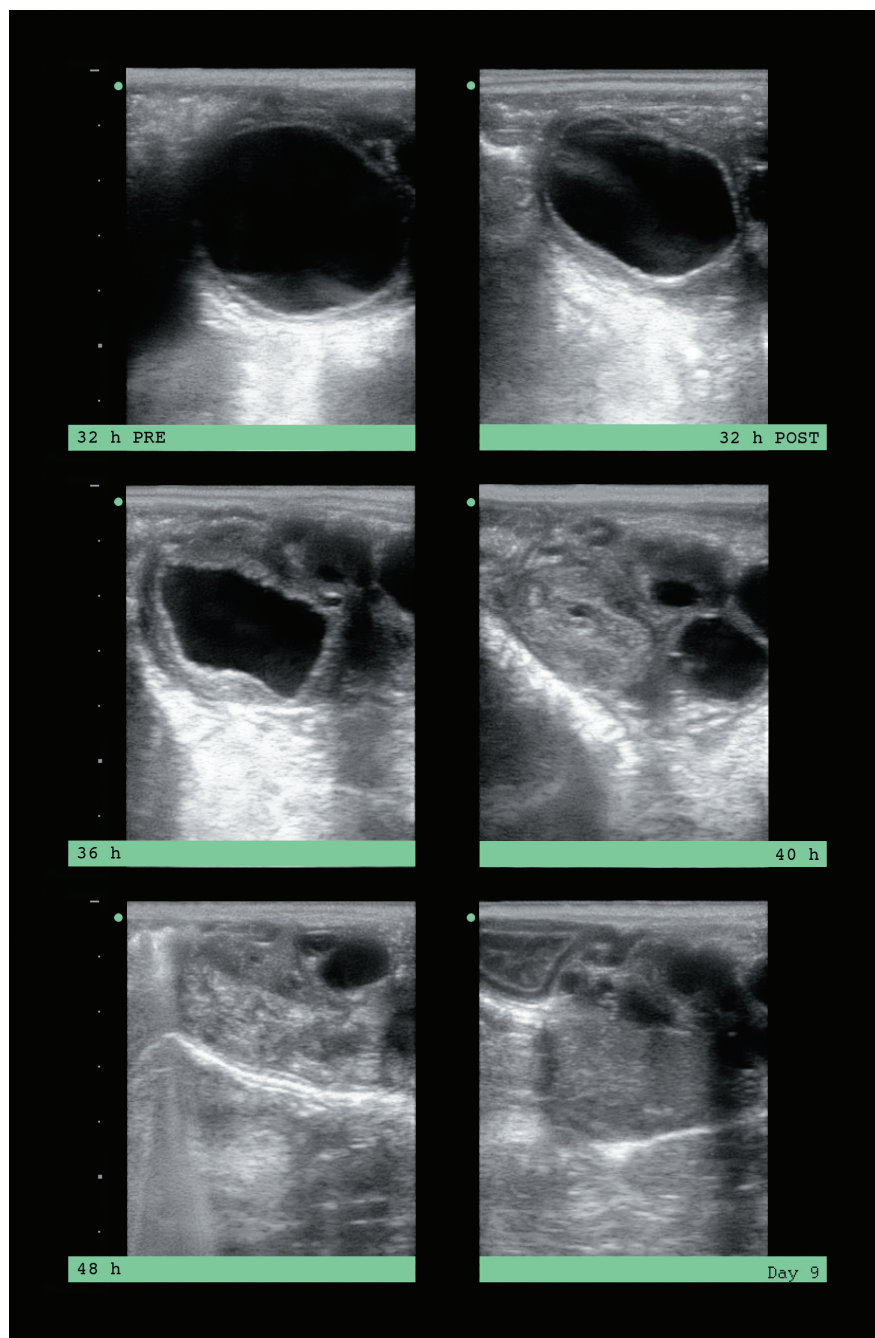


Fig 2: Representative B-mode ultrasonograms of a mare during the treatment cycle before (32 h PRE) and 15 min (32 h POST) after follicle puncture. Ovulation took place at 40 h after human chorionic gonadotrophin treatment. Note the development of the newly formed *corpus luteum* 16 h after follicle puncture (48 h) and the mature *corpus luteum* 9 days after ovulation (Day 9). This mare was diagnosed as pregnant 14 days after ovulation. Hour 0 = time of human chorionic gonadotrophin treatment.

0–11 mm) compared with the prepuncture diameter for the treatment and the control cycles, respectively (Fig 1). The degree of reduction was not different between groups ( $P>0.05$ ) at either 15 min or 4 h after follicle puncture. The endometrial oedema score did not differ between groups ( $P>0.05$ ) at any time-point analysed.

All 3 mares inseminated in their treatment cycles conceived (100% pregnancy rate). The same mares mated in their control cycles did not conceive (0% pregnancy rate). These 3 control cycles formed an LUF. The 3 embryonic vesicles identified 14 days after ovulation in the treatment cycles measured 13.0, 13.5 and 6.0 mm. The small for age vesicle corresponded to the mare that showed follicular haemorrhage before the follicle puncture at Hour 32 (Fig 5). This embryonic vesicle was measured again one day later (15 days after ovulation) for confirmation of pregnancy before manual reduction and measured 9.5 mm.

## Discussion

Prostaglandins are key factors in the process of ovulation [16]. The exact role of prostaglandins during the ovulatory process of mammals is not completely understood but it is believed that they activate several matrix metalloproteinases and plasminogen activator families [22]. These matrix metalloproteinases and other proteolytic enzymes produce an extensive tissue remodelling at the apex of the follicle that culminates in the rupture of the follicular wall and ovulation [16]. In the mare, the enzyme prostaglandin G/H synthase-2 (PGHS-2), also called COX-2, is expressed in granulosa cells 30 h after the beginning of the preovulatory LH surge, whether it is spontaneous or induced by hCG. The PGHS-2 is the first rate-limiting enzyme in the biosynthesis of prostanoids from arachidonic acid [17]. There is a parallel increase in the expression of PGHS-2 in

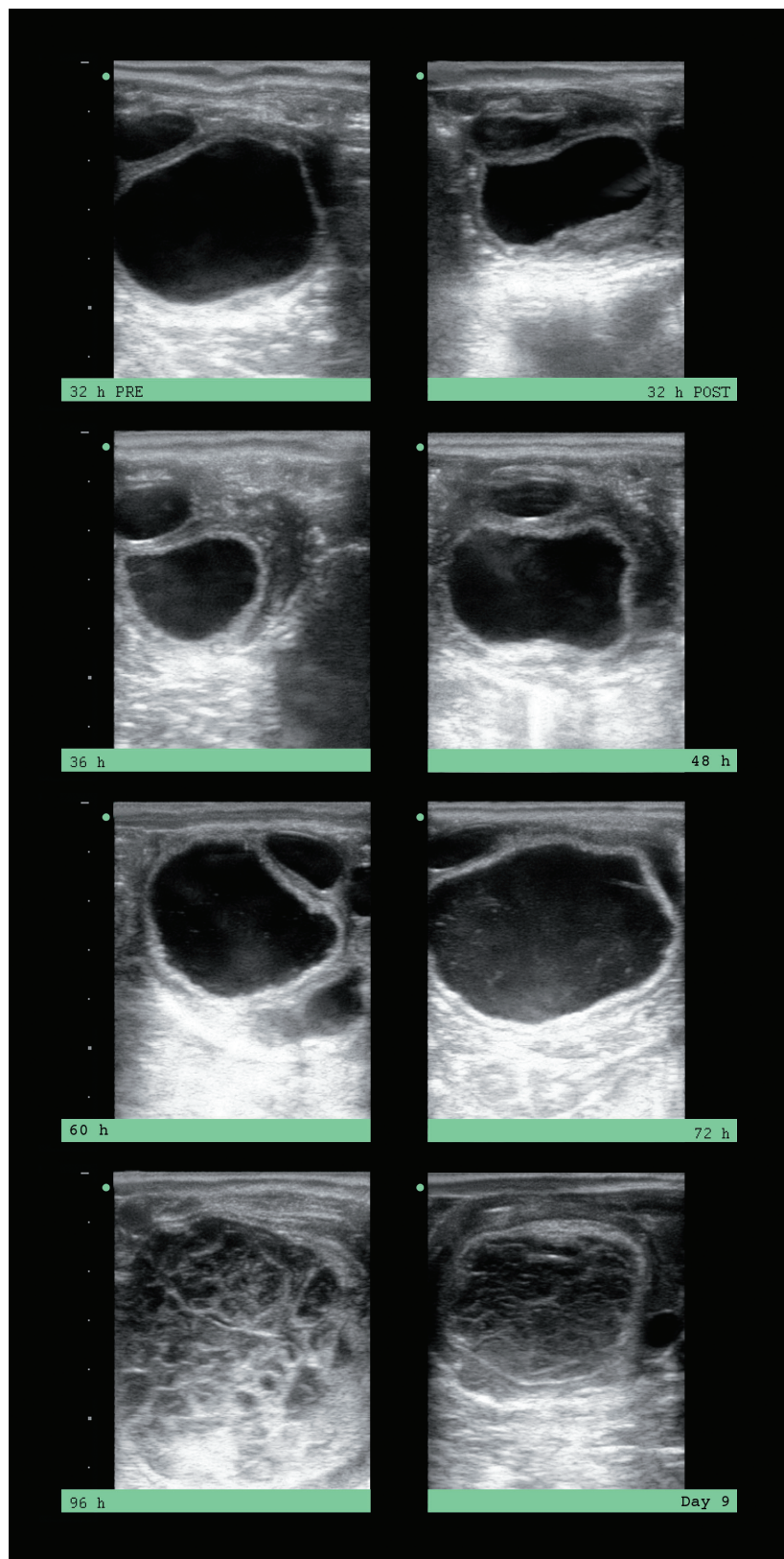


Fig 3: Representative B-Mode ultrasonograms of a mare during the control cycle at follicle puncture and development of a luteinised unruptured follicle (LUF) from 32 h after human chorionic gonadotrophin (hCG) until 9 days after beginning of LUF formation. Note the partial reduction in the follicle diameter after puncture (32 h POST and 36 h) presumably by loss of follicular fluid, and subsequent increase in diameter by entry of blood (echoic specks within the antrum) during the development of the LUF (48, 60 and 72 h). The LUF contents organised, forming a network of echoic strands 96 h after hCG (96 h). Hour 0 = time of hCG treatment.



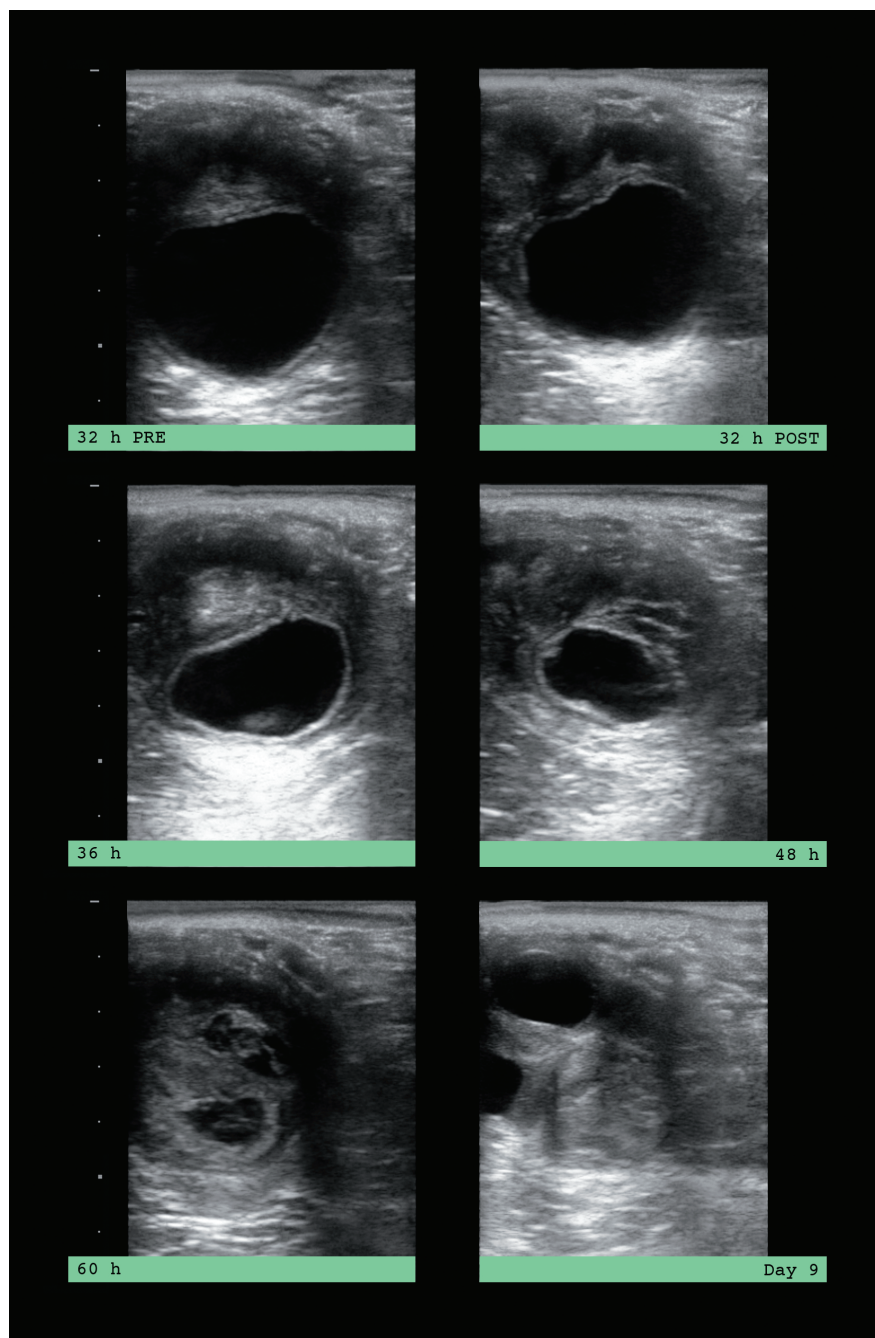


Fig 4: Representative B-Mode ultrasonograms of the dominant follicle in the mare that ovulated during the control cycle despite treatment with flunixin-meglumine. Note the gradual reduction in follicle diameter between puncture (32 h POST) and 48 h after hCG treatment (48 h). At 60 h after human chorionic gonadotrophin the follicle appeared to have collapsed, although 2 small cavities were evident within the ovulatory area (60 h). A solid corpus luteum developed 9 days after ovulation (Day 9). Hour 0 = time of hCG treatment.

granulosa cells and in the concentration of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub> in follicular fluid 33–36 h after hCG administration at a mean concentration of 40 and 10 ng/ml of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub>, respectively [17]. These data underline the rationale for designing a treatment protocol that delivers exogenous PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub> into the follicle at the expected time of physiological appearance (Hour 32) and at the same PGE<sub>2</sub>/PGF<sub>2α</sub> concentration ratio of 4:1. The overall concentration used in the present study (500/125 µg) exceeded the physiological concentrations expected in follicular fluid at the same time for the average volume of fluid of 20–30 ml in a follicle of 35 mm in diameter [17]. However, this higher concentration was chosen to account for any possible loss of treatment solution during the follicle puncture due to leakage of follicular fluid.

The chosen solution of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub> used in the present study seemed to induce ovulation consistently 4–16 h after treatment in mares with pharmacological inhibition of endogenous production of prostaglandins.

The positive effect upon ovulation can be attributed to the prostaglandins themselves rather than to the puncture of the follicular wall. It is true that the follicular collapse could have been precipitated by damage to the follicle wall during the process of follicle puncture. However, the majority of control mares (80%) did not ovulate but developed an LUF as expected, despite the follicle puncture to deliver the placebo. Similarly, the results of 2 previous studies in which mares were treated with the same FM protocol but in which the follicles were not punctured, showed that 27% [19] and 17% [18] of the mares did ovulate despite FM treatment. However, it is not known whether both types of prostaglandin (PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub>) are necessary to induce normal ovulation successfully. In this regard, a previous study compared the effect of PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub> on the ovulation rate in rats treated with indomethacin, another PGHS-2 inhibitor [23]. The PGE series were superior to PGF<sub>2α</sub> in inducing normal follicle rupture. Although PGF<sub>2α</sub> was only partially effective in inducing ovulation, it

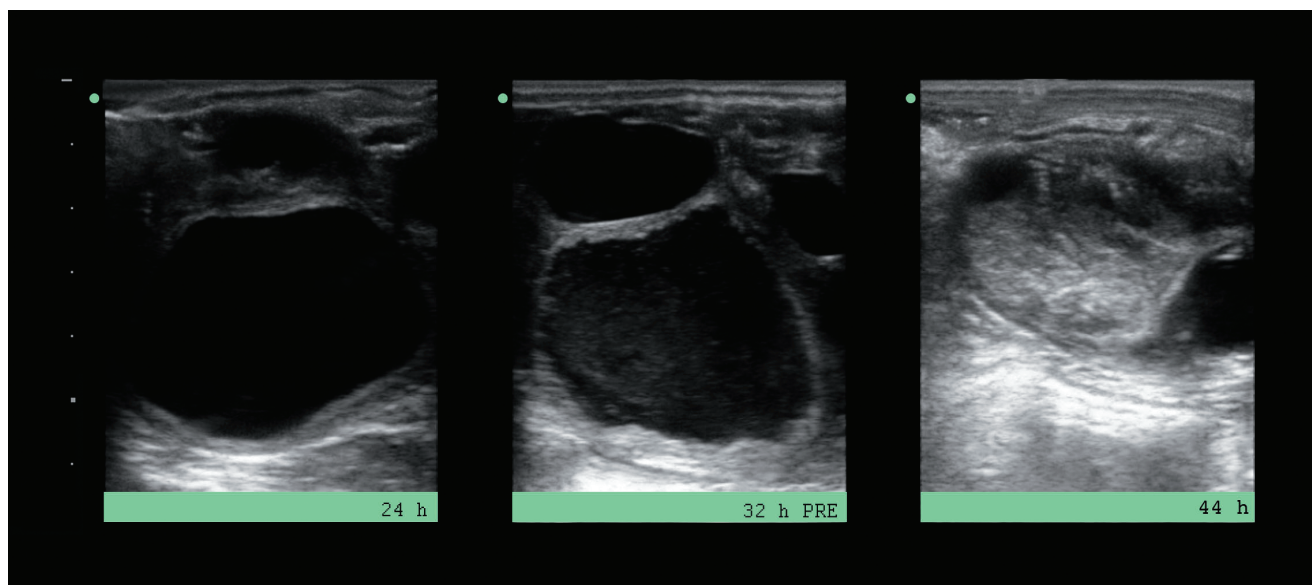


Fig 5: B-mode ultrasonograms of a mare during the treatment cycle. Note the moderate follicular haemorrhage evidenced by presence of numerous echoic specks within the antrum 32 h after hCG treatment but before follicle puncture (32 h PRE). The follicle collapsed 42–44 h after hCG (12 h after puncture and the delivery of 500 µg PGE<sub>2</sub> and 125 µg of PGF<sub>2α</sub>). This mare became pregnant. However, the embryonic vesicle was small for age and measured only 6.0 mm 14 days after ovulation. Hour 0 = time of hCG treatment.

was superior to rats from the control group treated with indomethacin only. A recent study in mares tried to reverse the inhibitory effect of FM on ovulation by systemic administration of cloprostenol (a PGF synthetic analogue), with disappointing results [24]. Whether the lack of ovulatory effect was due to the type, dose or route of administration of the prostaglandin is not known. Nevertheless, it is disappointing, since PGF<sub>2α</sub> and its analogues are drugs readily available to equine practitioners. Furthermore, a systemic route would be more practical, rapid and inexpensive than intrafollicular delivery. Further research should be carried out to determine the exact roles that the route of administration, dose and type of prostaglandin play in the induction of ovulation.

During their treatment cycles, all mares ovulated within the expected time window of 36–48 h after hCG, which is the common period reported for induction of ovulation after hCG administration [25]. The timing of ovulation depends on the time at which PGHS-2 is expressed in granulosa cells and the prostaglandins are secreted into the follicular fluid. This timing is approximately 10 h prior to ovulation in several mammals, including the mare [17]. The current results are in agreement with the latter statement since all mares ovulated 4–16 h after prostaglandin treatment, and in the 2 mares scanned more frequently, at exactly 8 and 10 h after treatment.

The treatment protocol used in this study not only induced follicle wall rupture and ovulation but also allowed normal release of the oocyte into the oviduct, as all 3 inseminated mares conceived. As in previous studies on the pregnancy rate of mares with spontaneous HAF [1], the 3 mares that developed an LUF after insemination in their control cycles, did not conceive (0% pregnancy rate). Histological studies in rabbits have shown that the oocyte remains trapped within the LUF's network of organised contents and therefore oocyte release into the oviduct and fertilisation are not possible [26]. One mare showed signs of LUF development (moderate to heavy presence of echoic specks) before follicle treatment (before Hour 32) that may indicate that she had already initiated the preovulatory surge of LH before hCG treatment. It has been shown that the first appearance of echoic specks in FM-induced LUF occurs 40–44 h after hCG [19].

The pathogenesis of spontaneous HAF is largely unknown. To date there has not been evidence of any link between the development of HAF and the lack of intrafollicular prostaglandins as the mechanism to inhibit follicular wall rupture and ovulation in this anovulatory condition. Therefore, the fact that the treatment protocol in the present study was able to reverse the inhibitory effect of FM on prostaglandin production and ovulation does not imply that it would work in mares with spontaneous

HAF. Nonetheless, the results of the current study are encouraging and it has been shown that the ultrasound and hormonal characteristics of spontaneous HAF and FM-induced LUF are similar [20].

In conclusion, intrafollicular administration of 500 µg of PGE<sub>2</sub> and 125 µg of PGF<sub>2α</sub> 32 h after hCG induces ovulation and pregnancy in mares treated with flunixin-meglumine during the periovulatory period.

### Authors' declaration of interests

No competing interests have been declared.

### Ethical animal research

Animal procedures were approved by the local animal welfare committee of the Universidad CEU Cardenal Herrera (ref: PRCEU-UCH 13/14).

### Source of funding

This study was funded by the Universidad CEU Cardenal Herrera project number PRCEU-UCH 13/14, and the Generalitat Valenciana project number GV-2014/129.

### Acknowledgements

The authors thank the undergrad students Eva Bailén, Aida Palatsi, Sandra Mateu and Santiago Alonso for their invaluable help in collecting the data. This article is intended to be part of the PhD thesis dissertation of Miss Rebeca Martínez-Bovi.

### Authorship

J. Cuervo-Arango contributed to study design, study execution, data analysis and interpretation, preparation of the manuscript and final approval of the manuscript. R. Martínez-Bovi contributed to study execution, data analysis, figure creation and final approval of the manuscript.

### Manufacturers' addresses

<sup>a</sup>Sonosite Ibérica, Madrid, Spain.

<sup>b</sup>Divasa Farmavic S.A, Tarragona, Spain.

<sup>c</sup>Schering-Plough España, Alcobendas, Spain.

<sup>d</sup>Pfizer España, Alcobendas, Spain.

<sup>e</sup>Esteve Veterinaria, Tarragona, Spain.

<sup>f</sup>Fort Dodge Laboratories, Girona, Spain.

<sup>g</sup>Honda Electronics España, Madrid, Spain.

<sup>h</sup>Minitab Inc, State College, Pennsylvania, USA.

## References

- McCue, P.M. and Squires, E.L. (2002) Persistent anovulatory follicles in the mare. *Theriogenology* **58**, 541-543.
- Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O. and Beg, M.A. (2007) Incidence, endocrinology, vascularity, and morphology of hemorrhagic anovulatory follicles in mares. *J. Equine Vet. Sci.* **27**, 130-139.
- Ellenberger, C., Müller, K., Schoon, H.A., Wilsher, S. and Allen, W.R. (2009) Histological and immunohistochemical characterization of equine anovulatory haemorrhagic follicles (AHFs). *Reprod. Domest. Anim.* **44**, 395-405.
- Cuervo-Arango, J. and Newcombe, J.R. (2009) The effect of hormone treatments (hCG and cloprostenol) and season on the incidence of hemorrhagic anovulatory follicles in the mare: a field study. *Theriogenology* **72**, 1262-1267.
- Cuervo-Arango, J. and Newcombe, J.R. (2010) Risk factors for the development of haemorrhagic anovulatory follicles in the mare. *Reprod. Domest. Anim.* **45**, 473-480.
- Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O. and Beg, M.A. (2006) Conversion of a viable preovulatory follicle into a hemorrhagic anovulatory follicle in mares. *Anim. Reprod.* **3**, 29-40.
- Ginther, O.J. and Pierson, R.A. (1989) Regular and irregular characteristics of ovulation and the interovulatory interval in mares. *J. Equine Vet. Sci.* **9**, 4-12.
- Marik, J. and Hulka, J. (1978) Luteinized unruptured follicle syndrome: a subtle cause of infertility. *Fertil. Steril.* **29**, 270-274.
- Katz, E. (1988) The luteinized unruptured follicle and other ovulatory dysfunctions. *Fertil. Steril.* **50**, 839-850.
- Qublan, H., Amarin, Z., Nawasreh, M., Diab, F., Malkawi, S., Al-Ahmad, N. and Balawneh, M. (2006) Luteinized unruptured follicle syndrome: incidence and recurrence rate in infertile women with unexplained infertility undergoing intrauterine insemination. *Hum. Reprod.* **21**, 2110-2113.
- Check, J.H. (2007) Ovulation defects despite regular menses: part III. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* **34**, 133-136.
- Coulam, C.B., Hill, L.M. and Breckle, R. (1982) Ultrasonic evidence for luteinization of unruptured preovulatory follicles. *Fertil. Steril.* **37**, 524-529.
- Coetsier, T. and Dhont, M. (1996) Complete and partial luteinized unruptured follicle syndrome after ovarian stimulation clomiphene citrate/human menopausal gonadotrophin/human chorionic gonadotrophin. *Hum. Reprod.* **11**, 583-587.
- Killick, S. and Elstein, M. (1987) Pharmacologic production of luteinized unruptured follicles by prostaglandin synthetase inhibitors. *Fertil. Steril.* **47**, 773-777.
- Priddy, A.R., Killick, S.R., Elstein, M., Morris, J., Sullivan, M., Patel, L. and Elder, M. (1990) The effect of prostaglandin synthetase inhibitors on human preovulatory follicular fluid prostaglandin, thromboxane, and leukotriene concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **71**, 235-242.
- Robker, R.L., Russell, D.L., Yoshioka, S., Sharma, S.C., Lydon, J.P., O'Malley, B.W., Espey, L.L. and Richards, J.S. (2000) Ovulation: a multi-gene, multistep process. *Steroids* **65**, 559-570.
- Sirois, J. and Dore, 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**, 4427-4434.
- Cuervo-Arango, J. and Domingo-Ortiz, R. (2011) Systemic treatment with high dose of flunixin-meglumine is able to block ovulation in mares by inducing hemorrhage and luteinization of follicles. *Theriogenology* **75**, 707-714.
- Cuervo-Arango, J., Beg, M.A. and Ginther, O.J. (2011) Follicle and systemic hormone interrelationships during induction of luteinized unruptured follicles with a prostaglandin inhibitor in mares. *Theriogenology* **76**, 361-373.
- Cuervo-Arango, J. and 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.
- Carnevale, E.M. (2004) Oocyte transfer and gamete intra-fallopian transfer in the mare. *Anim. Reprod. Sci.* **82-83**, 617-624.
- Li, Q., Jimenez-Krassel, F., Kobayashi, Y., Ireland, J.J. and 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.
- Gaytan, F., Tarradas, E., Bellido, C., Morales, C. and Sánchez-Criado, J.E. (2002) Prostaglandin E(1) inhibits abnormal follicle rupture and restores ovulation in indomethacin-treated rats. *Biol. Reprod.* **67**, 1140-1147.
- Cuervo-Arango, J. (2012) The effect of systemic administration of cloprostenol on ovulation in mares treated with a prostaglandin synthase inhibitor. *Reprod. Domest. Anim.* **47**, 32-38.
- Ginther, O.J., Beg, M.A., Gastal, E.L., Gastal, M.O. and Cooper, D.A. (2009) Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17 $\beta$ -decrease and a more rapid LH increase in mares. *Anim. Reprod. Sci.* **114**, 311-317.
- Salhab, A.S., Amro, B.I. and Shomaf, M.S. (2003) Further investigation on meloxicam contraceptive in female rabbits: luteinizing unruptured follicles, a microscopic evidence. *Contraception* **67**, 485-489.



## **ARTÍCULO III**



## Follicle Diameter and Systemic Hormone Interrelationships during Induction of Follicle Collapse with Intrafollicular Prostaglandin E2 and F2 $\alpha$ in Mares

R Martínez-Boví and J Cuervo-Arango

*Facultad de Veterinaria, Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Universidad CEU, Cardenal Herrera, Valencia, Spain*

### Contents

The objectives were to determine: (i) whether intrafollicular administration of PGE2 and PGF2 $\alpha$  to mares would hasten follicle collapse and (ii) the differences in reproductive hormone characteristics in mares with spontaneous and prostaglandin-induced follicle collapses. Six mares were followed for two oestrous cycles each: when the mares reached a follicle diameter of 30–35 mm and showed mild-to-moderate endometrial oedema, mares were administered a single 0.5 ml dose containing 500  $\mu$ g PGE2 and 125  $\mu$ g PGF2 $\alpha$  (treatment cycle) or a placebo (0.5 ml of water for injection; control cycle) into the preovulatory follicle (Hour 0). Blood samples were collected, and serial ultrasound examinations were performed until follicle collapse. Treated mares showed follicle collapse significantly earlier (20.0  $\pm$  5.9 h) than the control mares (72.0  $\pm$  10.7 h). The LH, progesterone, total oestrogens and oestradiol concentrations did not differ between groups; however, the progesterone concentration increased more between 48 and 72 h after follicle injection in the treatment compared to the control cycles ( $P < 0.05$ ). In conclusion, intrafollicular treatment with PGE2 and PGF2 $\alpha$  hastened follicle collapse in mares without the simultaneous use of an inductor of ovulation; despite the early induction of follicle collapse, the profiles of LH and oestradiol were not altered. This study provides information on the role of prostaglandins (PGs) in the process of follicle wall rupture and collapse and suggests that this may happen even before the beginning of the sharp rise in circulating LH at the final stage of the ovulatory surge.

### Introduction

The process of ovulation is modulated by gonadotropins, in particular luteinizing hormone (LH). Cessation of follicular growth, the change in rate of LH output (from slow to rapid) at the end of the ovulatory surge, the abrupt decrease in oestradiol and increase in intrafollicular progesterone, and decreasing endometrial oedema score (Gastal et al. 2006) are all preceding signs associated with ovulation (Pattison et al. 1974; Hayes et al. 1985; Ginther et al. 2006). The LH ovulatory surge in the mare is long, compared with other domestic species, approximately 10 days (Ginther et al. 2008). The LH concentration in the ovulatory surge increases slowly (beginning at early oestrus, just after the end of luteolysis) and then increases more rapidly, with the transition between the slow and rapid increases occurring at the peak of the oestradiol surge, approximately 2 days before ovulation, as reviewed in (Ginther et al. 2008). Finally, the LH surge reaches its peak concentration 1 day after ovulation (Ginther et al. 2008).

The LH surge triggers a cascade of events within the preovulatory follicle which lead to ovulation, including the expression of specific granulosa cell genes and the synthesis and/or activation of proteases implicated in rupturing the follicular wall (Richards 1994). One of these upregulated genes encodes prostaglandin G/H synthase-2 (PGHS2), an important rate-limiting enzyme in prostaglandin production (Sirois et al. 2004). In mares, PGHS2 is expressed in granulosa cells 30 h after treatment with human chorionic gonadotropin (hCG), a hormone that induces a sharp rise in LH concentration (Ginther et al. 2009), and consequently the concentration of PGE2 and PGF2 $\alpha$  in the follicular fluid gradually increases between 30 and 39 h after hCG administration (Sirois and Dore 1997). The interval between PGHS2 induction and follicle wall rupture and collapse is approximately 10 h in several domestic species, including mares (Sirois and Dore 1997).

The essential role of prostaglandins in the process of ovulation has been demonstrated in previous studies which used prostaglandin synthesis inhibitors to block ovulation in rats (Armstrong and Grinwich 1972), rabbits (Grinwich et al. 1972), humans (Killick and Elstein 1987) and mares (Cuervo-Arango and Domingo-Ortiz 2011; Cuervo-Arango 2012). Several studies carried out in other species overrode the inhibitory effect of indomethacin, a prostaglandin synthesis inhibitor, by treatment with PGE2 (Tsafriri et al. 1972), PGF2 $\alpha$  (Holmes et al. 1983) or both (Sogn et al. 1987; Gaytan et al. 2002). However, the exact role of prostaglandins during the ovulatory process of mammals is not completely understood, but it is believed that they activate several families of matrix metalloproteinases and plasminogen activator that produce extensive tissue remodelling at the apex of the follicle, and which culminates in the rupture of the follicle wall and ovulation (Robker et al. 2000; Li et al. 2006). All this process takes place during the physiological LH ovulatory surge, and therefore, it is not known exactly to what extent LH is essential to trigger the cascade of events that lead to the successful rupture of the follicle wall (Robker et al. 2000). It appears, however, that LH may not be necessary for follicle wall rupture as one study carried out in LH-blocked rats showed follicle collapse and oocyte maturation in 81% and 90% of rats treated with exogenous prostaglandin E2, respectively (Tsafriri et al. 1972).

The objectives of the present study were to determine whether intrafollicular administration of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> $\alpha$  to mares in early to mid-oestrus (with a follicle diameter of 30–35 mm) would hasten follicle collapse, and to establish the differences in reproductive hormone characteristics in mares with spontaneous and prostaglandin-induced follicle collapses. It was hypothesized that intrafollicular administration of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> $\alpha$  to mares in early to mid-oestrus without the simultaneous treatment with an inductor of ovulation would induce follicle collapse within 12 h of treatment.

## Materials and Methods

### Animals and ultrasound examinations

Six mixed-breed cyclic mares aged five to 18 years old and weighing between 350 and 550 Kg were studied during 2 oestrous cycles each (12 cycles in total), in a crossover design between May and July 2014. The mares belonged to the Universidad CEU Cardenal Herrera Veterinary School research and teaching herd located in Náquera, Spain (Northern Hemisphere). Mares were kept stabled with access to *ad libitum* water and fed alfalfa hay and cereal grain. Animal procedures were handled in accordance with the Spanish Department of Agriculture Guide for Care and Use of Animals in Research.

The genital tract was examined transrectally using a B-mode ultrasound scanner (SonoSite NanoMaxx) with an 8-MHz linear array probe. All mares had ovulated at least once before the start of the study, which was confirmed by the presence of a corpus luteum (CL). Ultrasound examinations were performed every day from Day 15 (taking Day 0 as the day of ovulation) until intrafollicular treatment administration (Hour 0). After intrafollicular injection, ultrasound examinations were performed at Hours 12, 24, 48, 72 and daily until follicle collapse. Endometrial oedema was scored on a 0–5 scale (0 = dioestrous-like echotexture, with no endometrial folding; 5 = maximum degree of endometrial folding). The follicular diameter was measured using electronic callipers by taking the average of 2 linear measurements of the antrum (taken at right angles) when the size of the follicle was maximal. Follicle collapse was diagnosed when the previous preovulatory follicle had disappeared and when less than 10% of the follicular fluid remained.

The term ‘follicle collapse’ was used instead of ovulation to refer to the ovulation-like event induced by the intrafollicular treatment of exogenous prostaglandins, because it is not known whether a normal ovulation took place. For simplicity and comparison purposes, follicle collapse was also used to refer to spontaneous ovulation in mares during their control cycles. The length of dioestrus was calculated from the day of follicle collapse (Day 0) to the first day of the following oestrus in which endometrial oedema was detected.

### Experimental design and intrafollicular puncture

For each mare, 2 oestrous cycles, with a wash-out period of 1 cycle in between, were randomly allocated to a control (n = 6) or treatment (n = 6) group in a crossover design. The first cycle of 3 mares was a control cycle while the remaining 3 were treatment cycles. When the mares’ follicular diameter reached  $\geq 30$  mm (between 30 and 35 mm) and they showed mild-to-moderate endometrial oedema (score of 2–3 of 5), a blood sample was taken from the jugular vein and the preovulatory follicle of each mare was injected with 500  $\mu$ g PGE<sub>2</sub> (dinoprostone 10 mg/ml; Prostaglandin E<sub>2</sub>; Pfizer) and 125  $\mu$ g PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (dinoprost tromethamine 5 mg/ml; Dinolytic; Pfizer) diluted in 0.5 ml of sterile water for injection (treatment cycles) or a placebo (0.5 ml of water only, control cycles). The time of injection was set as Hour 0. The PGE<sub>2</sub>/PGF<sub>2</sub> $\alpha$  dose and ratio were chosen according to a previous study (Martinez-Bovi and Cuervo-Arango 2016) in which this protocol successfully induced follicle collapse within 12 h of treatment in 100% of mares. The intrafollicular puncture was performed with the mare restrained in the stocks, after sedation with an i.v. dose of 0.01 mg/kg detomidine hydrochloride (Domosedan) and 0.02 mg/kg i.v. butorphanol tartrate (Torbugesic); the perineum was thoroughly cleansed before the procedure was carried out.

The ultrasound-guided follicular puncture was performed using an ultrasound scanner (Honda Electronics HS-1500 VET) equipped with a 9 MHz convex transvaginal transducer (HCV 3710MV). The transducer was introduced into the vagina and placed next to the side of the vaginal fornix ipsilateral to the ovary containing the target follicle. A 5-cm-long 22-gauge needle was fitted to the end of the ultrasound probe and was connected via a silicone tube to a 1-ml syringe containing the treatment or the placebo solution. Once the syringe and needle were adjusted to the silicone tube, the 0.5 ml solution was aspirated directly from the needle, so the air flow generated by the syringe pushed the whole solution volume into the follicle. During the ultrasound-guided follicle puncture, the needle was introduced into the follicle antrum while the ovary was manually held per rectum. Care was taken to avoid any excessive movement of the ovary during the follicle puncture so that the wall was minimally damaged. No antibiotic or other prophylactic treatment was administered to any mares following the follicle puncture. No mare showed signs of peritonitis during the study. Mares were scanned transrectally just before and 15 min after follicle injection to measure the follicle diameter and to assess any fluid loss caused by it.

Thereafter, blood samples were taken at Hours 0, 12, 24, 48, 72 and daily until follicle collapse. Blood was collected from the jugular vein into heparinized tubes, and samples were immediately placed in ice. The samples were centrifuged (2000  $\times g$  for 10 min), and the plasma was decanted and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until it



was assayed. A final ultrasound examination and blood sample were taken 9 days (216 h) after follicle collapse to evaluate the function and morphology of the CL.

### Hormonal assays

The blood samples were assayed for LH, oestradiol, total oestrogens and progesterone concentrations. The progesterone concentration was determined at 24, 48 and 72 h after follicle puncture and 9 days after follicle collapse. The LH, oestradiol and total oestrogen concentrations were determined at Hour 0, 12, 24, 48 and 72 (Hour 0 = hour of follicle puncture). The LH concentration was determined using a commercial equine solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test kit with a monoclonal antibody against equine LH (Endocrine Technologies, INC., Newark, California). The intra-assay coefficient of variability (CV) was 14.3%, and the sensitivity was 0.43 ng/ml. The progesterone and oestradiol plasma concentrations were assayed using a competitive solid-phase ELISA (DRG Instruments, GmbH, Marburg, Germany). These steroid hormones were determined without extraction from plasma. The sensitivity was 0.02 ng/ml for progesterone and 1.4 pg/ml for oestradiol, and the intra-assay CVs were 3.9% and 8.5%, respectively. The concentration of total plasma oestrogens was assayed by radioimmunoassay in an external laboratory (Bet Labs, Bet Pharm plc, by R.H. Douglas): the intra-assay CV was 8.2%, and the sensitivity was 20 pg/ml.

### Statistical analyses

All data were tested for normality using the Anderson-Darling test. Non-normally distributed data were ranked and computed using the SYSTAT 13 statistical software (SYSTAT Software Inc. Chicago IL). Sequential data (LH, oestradiol, total oestrogens and progesterone concentrations) were analysed using a general linear mixed model of variance with a repeated statement to account for autocorrelation between sequential

observations. If a *group, day or group-by-day* interaction effect was found, the data were further tested using an unpaired Student's *t*-test within each hour, whereas a difference between hours within a group was examined using a paired Student's *t*-test. The statistical probability was considered significant when  $p < 0.05$  and considered to approach significance when  $p$  was  $>0.05$  and  $<0.1$ . Data are reported as the mean  $\pm$  the standard error of the mean (*SEM*), unless otherwise stated. The difference between groups in the mean interval between intrafollicular injection to follicle collapse and dioestrous length were tested using an unpaired *t*-test.

### Results

The mean interval from intrafollicular injection (Hour 0) to follicle collapse was shorter ( $p < 0.01$ ; Table 1) in treated ( $20 \pm 5.9$  h) than in control cycles ( $72 \pm 10.7$  h). Four mares in their treatment cycles (4 of 6) showed follicle collapse within 12 h of prostaglandin treatment (Fig. 1), and follicle collapse occurred in the remaining two mares at Hours 24 and 48, respectively. During the control cycles, no mare showed follicle collapse within 12 h of follicle puncture (0 of 6); 3 mares showed follicle collapse at Hour 48 and the remaining 3 at Hour 96 (Fig. 2). One mare in its control cycle showed a follicle filled with clotted blood after the puncture; the follicle did not show signs of luteinization, and it grew until follicle collapse (Hour 96). The reduction in diameter 15 min after follicle puncture was  $3.3 \pm 1.2$  mm and  $3.6 \pm 2.4$  mm in the treatment and control cycles, respectively ( $p > 0.1$ ).

There was no difference in the mean concentrations of total oestrogens and oestradiol between the treatment and control groups ( $p > 0.1$ ; Fig. 3). Similarly, there was no difference in the mean LH concentration profile between groups ( $p > 0.1$ ; Fig. 4). However, a significant ( $p = 0.03$ ) time effect on LH concentration was observed between 24 and 48 h, in the treatment group; in the control group, this effect approached significance ( $p = 0.08$ ). The individual LH profiles for the 4 mares

Table 1. Follicle characteristics and events in treatment and control mares

Group	Time of intrafollicular injection			Interval from follicle injection to ovulation (h)	Dioestrous length (days)	CL diameter at Day 9 (mm)
	Follicle diameter (mm)		Day of cycle (days)			
	Pre-injection	Post-injection				
Control (n = 6)	33.7 $\pm$ 1.2	30.1 $\pm$ 1.4	18.2 $\pm$ 1.3	72 $\pm$ 10.7 <sup>b</sup>	15.5 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	24.9 $\pm$ 1.3
Treatment (n = 6)	33.2 $\pm$ 1.0	30.2 $\pm$ 2.0	18.5 $\pm$ 0.6	20 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup>	18.3 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	24.3 $\pm$ 1.5

Within column, different letters indicate a significant difference in the interval from follicle injection to ovulation ( $p < 0.05$ ) and dioestrous length between groups ( $p < 0.01$ ).

The follicular puncture was performed when the follicle first reached a diameter of  $\geq 30$  mm (30 to 35 mm) and showed endometrial oedema (Hour 0). The Day of the cycle on which intrafollicular puncture was performed was calculated in base of the previous Day of ovulation (Day of ovulation = Day 0 of the cycle).

The length of dioestrus was calculated from the day of follicle collapse to the first day of the following oestrus in which endometrial oedema was detected.

Control: Intrafollicular injection of 0.5 ml of placebo solution (water for injection).

Treatment: Intrafollicular injection of 0.5 ml of prostaglandin solution (500  $\mu$ g PGE2 and 125  $\mu$ g PGF2 $\alpha$ ).

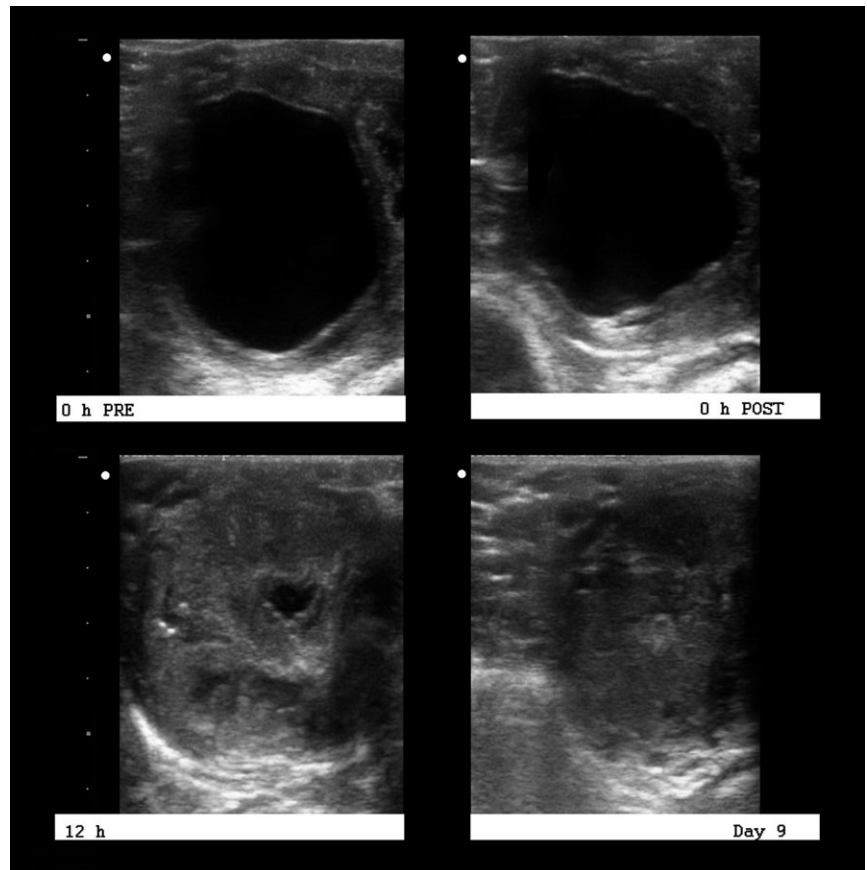


Fig. 1. Representative B-mode ultrasonograms of the preovulatory follicle in a mare during its treatment cycle before (0 h PRE) and 15 min after follicle puncture (0 h POST). Follicle collapse occurred 12 h after intrafollicular administration of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> $\alpha$ . Note the mature corpus luteum 9 days after follicle collapse (Day 9)

that responded to intrafollicular PGs administration with follicle collapse within 12 h of treatment are shown in Fig. 5. All ( $n = 3$ ) but one, individual profiles showed a gradual increase in the LH concentration from Hour 0 to Hour 72 (the peak concentration). The remaining mare (Mare 4) showed the LH peak concentration at Hour 48, after which decreased (Hour 72).

The *group* had no effect on progesterone concentration ( $p > 0.1$ ; Fig. 6). However, the *time* effect ( $p = 0.06$ ) and the *hour-by-group* interaction ( $p = 0.08$ ) approached significance. The progesterone concentration increased more between 48 and 72 h after PGs administration in treatment compared to the control cycles ( $p < 0.05$ ). However, the progesterone concentration 9 days after follicle collapse was not different between groups ( $p > 0.1$ ; Fig. 6). Mares in both groups developed a morphologically normal CL as shown by ultrasound. When normalized to the time of follicle collapse (Hour 0), the progesterone concentration at Hour 12, 36 and 60 was  $0.75 \pm 0.2$ ,  $0.74 \pm 0.3$  and  $1.1 \pm 0.1$  ng/ml, respectively, for the 4 mares that showed follicle collapse within 12 h of intrafollicular prostaglandin administration ( $n = 4$ ), and did not differ between these time points ( $p > 0.1$ ). The progesterone concentration in the rest of the treatment ( $n = 2$ ) and control cycles ( $n = 6$ ) could not be normalized to the time of follicle collapse because blood samples were not

available beyond 72 h (in treated mares) or 96 h (in control mares) after follicle puncture. The dioestrous length was longer ( $p < 0.05$ ) following prostaglandin-induced follicle collapse ( $18.3 \pm 1.2$  days) than after spontaneous (control cycle) follicle collapse ( $15.5 \pm 0.9$  day).

## Discussion

The hypothesis that intrafollicular administration of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> $\alpha$  to mares in early to mid-oestrus without the simultaneous treatment with an inductor of ovulation would induce follicle collapse was supported by the results of this study, as the majority of treated mares (4 of 6) had follicle collapse within 12 h of treatment. The PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> $\alpha$  treatment used in this experimental protocol was based on a recent study in which 100% of mares treated with a prostaglandin inhibitor ovulated after intrafollicular injection of this solution (Martinez-Bovi and Cuervo-Arango 2016). The protocol described in this current study seemed to induce follicle collapse in mares before it would have been expected according to the LH ovulatory surge. During the physiological LH periovulatory surge of mares, the peak concentration occurs 1 day after spontaneous or hCG-induced ovulation (Ginther et al. 2008). In contrast, 3 of 4 mares that responded to

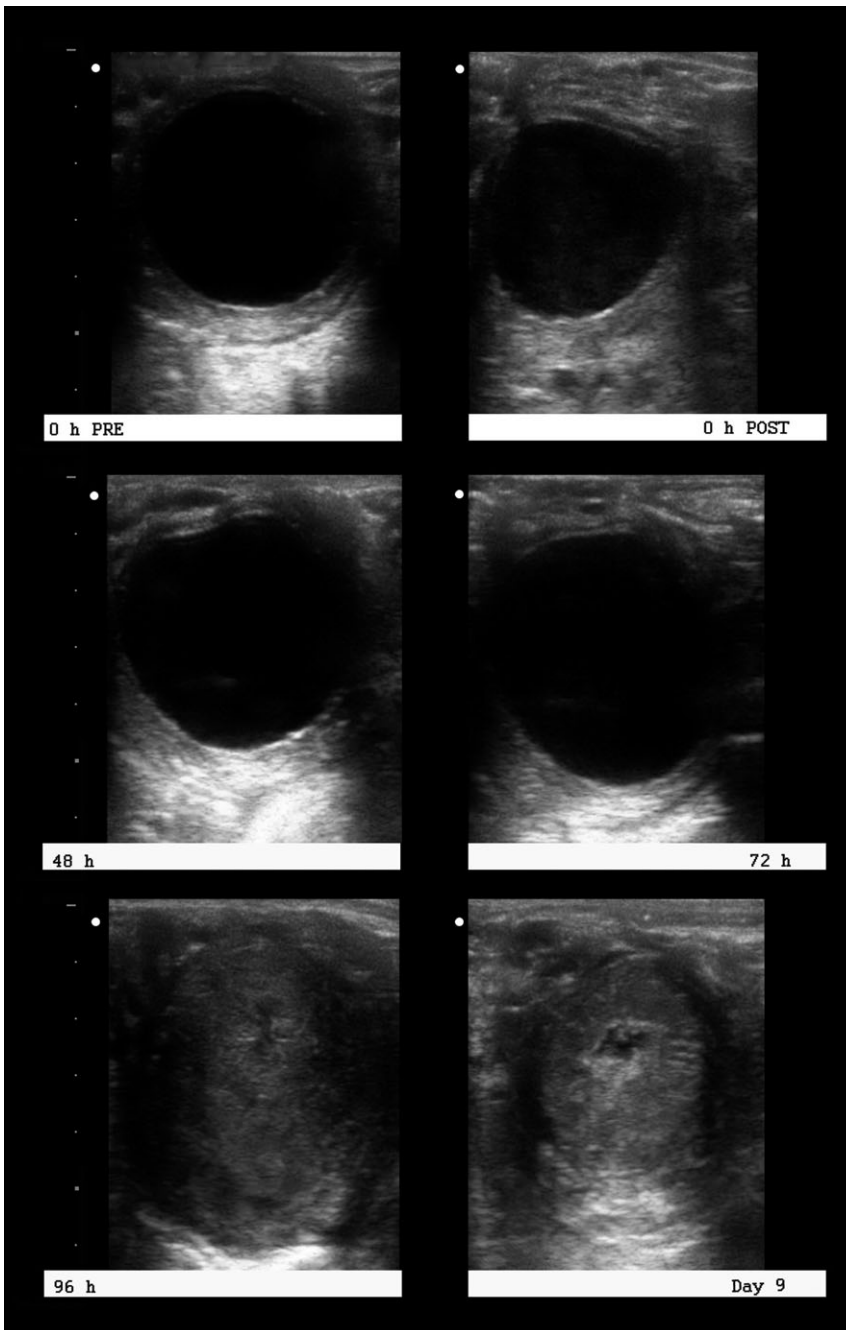


Fig. 2. Representative B-mode ultrasonograms of the preovulatory follicle in a mare during its control cycle before (0 h PRE) and 15 min after follicle puncture (0 h POST) showing the follicle at 48 and 72 h after puncture. Follicle collapse occurred between 72 and 96 h after intrafollicular administration of the placebo solution

intrafollicular prostaglandin administration with follicle collapse within 12 h of treatment showed increasing concentrations of LH, at least until Hour 72 (the last day of blood sampling). Thus, pointing towards an obligatory role of prostaglandins in the cascade of events that lead to follicle wall digestion and rupture. Following follicle collapse, LH continued to increase gradually in both treatment and control cycles. This finding indicates that the follicle collapse induced by the prostaglandin treatment did not block subsequent LH release. Furthermore, the intrafollicular treatment of

PGs was administered on average on Day 18 of the cycle, and the mean interovulatory interval in these mares was 19 days (they showed follicle collapse a mean of  $20 \pm 5.9$  h after follicle puncture). This is shorter than the reported (22.9 days) physiological interovulatory interval for the mare (Jacob et al. 2009), which confirms the hypothesis that intrafollicular PGs can hasten follicle collapse even during a non-physiological hormonal milieu (i.e. early stages of the final part of the LH ovulatory surge). Although the mares of the present study have had exposure to some LH (the LH

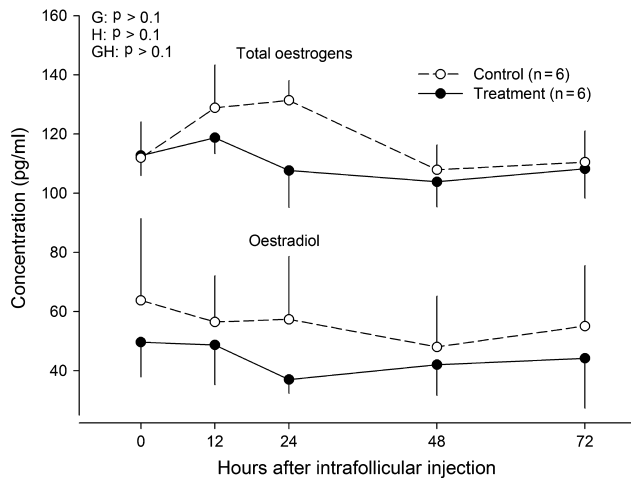


Fig. 3. Mean plasma total oestrogens and oestradiol concentrations  $\pm$  standard error mean (SEM) in treated and control mares after intrafollicular injection (Hour 0). The probabilities for the main effects of group (G) and hour (H) and the group-by-hour interaction (GH) are shown. Control: intrafollicular injection of 0.5 ml of placebo solution (water for injection); Treatment: intrafollicular injection of 0.5 ml of prostaglandin solution (500  $\mu$ g PGE2 and 125  $\mu$ g PGF2 $\alpha$ )

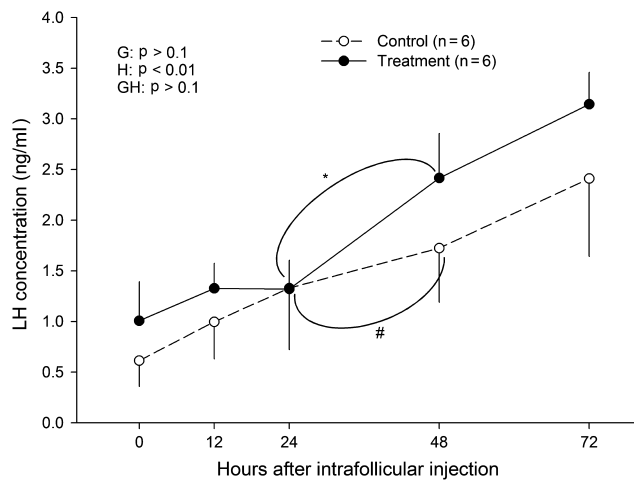


Fig. 4. Mean plasma luteinising hormone (LH) concentration  $\pm$  SEM in treated and control mares after intrafollicular injection (Hour 0). The probabilities for the main effects of group (G) and hour (H) and the group-by-hour interaction (GH) are shown. A significant difference ( $p = 0.03$ ) or a tendency ( $p = 0.08$ ) in the LH concentration between 24 and 48 h is indicated within the treatment (\*) and control (#) groups, respectively. Control: intrafollicular injection of 0.5 ml of placebo solution (water for injection); Treatment: intrafollicular injection of 0.5 ml of prostaglandins solution (500  $\mu$ g PGE2 and 125  $\mu$ g PGF2 $\alpha$ )

concentration was already increasing at the time of treatment), it does not necessarily mean that the LH exposure was critical for PGs-induced follicle collapse. In that line, a previous study in rats treated with Nembatul to block the LH ovulatory surge showed successful ovulation in 81% of treated animals after systemic administration of 1.5 mg of PGE2 per rat (Tsafirri et al. 1972).

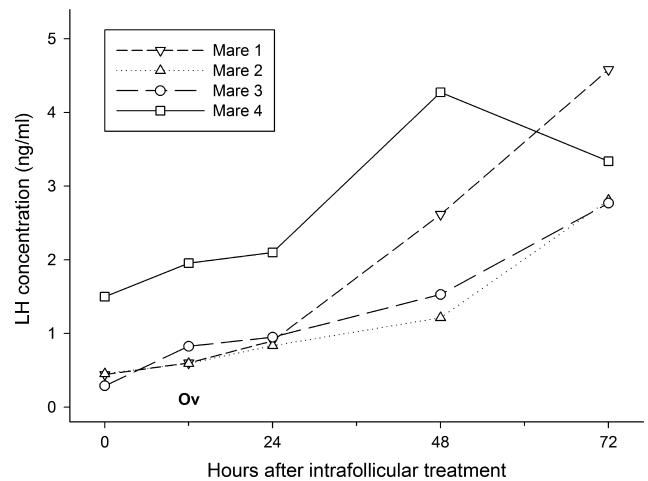


Fig. 5. Luteinising hormone (LH) concentration in plasma for individual mares treated with an intrafollicular injection of 0.5 ml of prostaglandins solution (500  $\mu$ g PGE2 and 125  $\mu$ g PGF2 $\alpha$ ) that showed follicle collapse (Ov) within 12 h of treatment

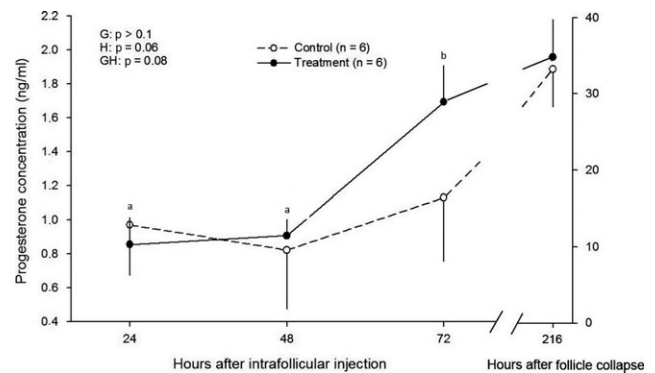


Fig. 6. Mean plasma progesterone concentration  $\pm$  SEM in treatment and control mares after intrafollicular injection (Hour 0) and 216 h (9 d) after follicle collapse. Probabilities for the main effects of group (G) and hour (H) and the group-by-hour interaction (GH) are shown. Lowercase letters (a, b) indicate a difference in the progesterone concentration ( $p < 0.05$ ) between 48 and 72 h in the treatment group. No differences were observed in the control group; and no differences in progesterone concentration were observed between groups 216 h after follicle collapse ( $p > 0.1$ ). Control: intrafollicular injection of 0.5 ml of placebo solution (water for injection); Treatment: intrafollicular injection of 0.5 ml of prostaglandins solution (500  $\mu$ g PGE2 and 125  $\mu$ g PGF2 $\alpha$ )

This study did not include a negative control group in which mares were not punctured in the follicle. It is possible that the follicle puncture in control mares to administer the vehicle might have induced some inflammation and earlier production of endogenous prostaglandins. Three of six control mares ovulated within 48 h of treatment, which is an interval relatively short, considering that the follicle puncture was performed at small follicle diameters of 30–35 mm. Nonetheless, this hypothesis if true, would further confirm the obligatory role of prostaglandins in the process of follicle wall rupture.

Intrafollicular injection of PGs did not affect the total oestrogens and oestradiol concentrations in plasma, and

the mean plasma levels observed were in agreement with previous studies carried out during the oestrous cycle in mares (Palmer and Terqui 1977; Meinecke et al. 1987). It is interesting to note that the early follicle collapse of treated mares did not interfere with the granulosa production of oestradiol, despite the complete evacuation of follicular fluid and folding of the follicle wall, as the oestradiol and oestrogens profiles were not different between the control and treatment groups.

The principal hormone that stimulates progesterone production by the CL is LH (Niswender and Nett 1988). The beginning of the increase in progesterone production is defined as the first day that the plasma progesterone concentration is over 1 ng/ml, 24 h after ovulation (Hinrichs et al. 1991). A previous study, in which the exact time of ovulation was detected with high accuracy (i.e. ultrasound examinations took place every 30 min until the detection of ovulation), showed that the first significant increase in progesterone concentration occurred between 12 and 24 h (0.5 vs 1.1 ng/ml) after the end of complete follicle evacuation, continued between 24 and 36 h (1.1 vs 2.6 ng/ml) and gradually increased until 96 h after ovulation (13.8 ng/ml) (Townson et al. 1989). In the present study, the progesterone concentrations in the 4 mares that responded to the intrafollicular prostaglandin treatment remained below 1 and 2 ng/ml within 36 and 60 h of follicle collapse, respectively. The fact that these mares showed follicle collapse before the final part of the LH surge might explain the slower increase in progesterone secretion by the new CL compared with previously reported data (Townson et al. 1989). Likewise, the slower increase in progesterone secretion during the first days of CL development could explain the greater duration of dioestrus in the treatment group. However, the more mature corpora lutea in treated mares appeared to recover their full progesterone secretion capacity, because the progesterone concentration in treated mares was similar to that of control mares 9 days after follicle collapse.

One study on follicular fluid aspiration in mares showed luteinization (a progesterone concentration over 2 ng/ml) 4 to 5 days after follicular puncture when the follicle diameter reached 30–35 mm, compared with control mares which were not aspirated (Hinrichs et al. 1991). In agreement with this, in our study, the onset of progesterone secretion was earlier in treated mares compared with controls.

## References

- Armstrong DT, Grinwich DL, 1972: Blockade of spontaneous and LH-induced ovulation in rats by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin biosynthesis. *I. Prostaglandins* **1**, 21–28.
- Cuervo-Arango J, 2012: The effect of systemic administration of cloprostenol on ovulation in mares treated with a prostaglandin synthetase inhibitor. *Reprod Domest Anim* **47**, 32–38.
- 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.
- Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ, 2006: Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Reproduction* **131**, 699–709.
- Gaytan F, Farradas E, Bellido C, Morales C, Sanchez-Criado JE, 2002: Prostaglandin E(1) inhibits abnormal follicle rupture and restores ovulation in indomethacin-treated rats. *Biol Reprod* **67**, 1140–1147.
- Ginther OJ, Utt MD, Bergfelt DR, Beg MA, 2006: Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. *Anim Reprod Sci* **95**, 144–150.

The fact that the intrafollicular injection of PGs was able to induce follicle collapse in the majority of mares does not imply that the oocyte was released successfully into the oviduct and that it could be fertilized. It seems unlikely; however, that a successful fertilization was possible, as the hormonal milieu (LH, oestradiol and progesterone) in the mares that responded with follicle collapse within 12 h of treatment was not different to that of controls, which ovulated on average 2.5 days later. Further fertility studies using a greater number of mares and semen with different longevity deposited into the uterus around the time of intrafollicular treatment with PGs are needed to elucidate the fertilization potential in mares treated with intrafollicular PGs.

In conclusion, intrafollicular administration of 500 µg of PGE2 and 125 µg of in mares with follicle diameters of 30–35 mm induced follicle wall rupture and collapse within 12 h of treatment in the majority of mares, but treatment with these prostaglandins did not alter the LH and oestrogens profile. In the 4 treated mares that responded to prostaglandin administration within 12 h, the circulating levels of progesterone remained low (below 1.2 ng/ml) for the first 60 h following follicle collapse. Nevertheless, the morphology and function of the CL in mares treated with intrafollicular prostaglandins 9 days after follicle collapse were not different from that of control mares.

## Acknowledgements

This study was funded by the Universidad CEU Cardenal Herrera project number FUSP-CEU-BSS-PPC-01-2014 and the Generalitat Valenciana project number GV-2014/129. The authors would like to thank the undergraduate students Sandra Mateu, Santiago Alonso, Eva Bailén and Aida Palatsi for their invaluable help in collecting the data. This article is intended to be part of the PhD thesis dissertation of Rebeca Martínez-Boví.

## Conflict of interest

None of the authors have any conflict of interest to declare.

## Author contributions

J.C-A designed the study. J.C-A and R.M-B performed the study. R. M-B analysed data and edited figures. J.C-A and R.M-B wrote the manuscript. Both authors contributed equally.

- Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA, 2008: Dynamics of the equine preovulatory follicle and periovulatory hormones: what's new? *J Equine Vet Sci* **28**, 454–460.
- Ginther OJ, Beg MA, Gastal EL, Gastal MO, Cooper DA, 2009: Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17beta-estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. *Anim Reprod Sci* **114**, 311–317.
- Grinwich DL, Kennedy TG, Armstrong DT, 1972: Dissociation of ovulatory and steroidogenic actions of luteinizing hormone in rabbits with indomethacin, an inhibitor of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins* **1**, 89–96.
- Hayes KE, Pierson RA, Scraba ST, Ginther OJ, 1985: Effects of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. *Theriogenology* **24**, 465–477.
- Hinrichs K, Rand WM, Palmer E, 1991: Effect of aspiration of the preovulatory follicle on luteinization, corpus luteum function, and peripheral plasma gonadotropin concentrations in the mare. *Biol Reprod* **44**, 292–298.
- Holmes PV, Janson PO, Sogn J, Kallfelt B, LeMaire WJ, Ahren KB, Cajander S, Bjersing L, 1983: Effects of PGF<sub>2</sub> alpha and indomethacin on ovulation and steroid production in the isolated perfused rabbit ovary. *Acta Endocrinol (Copenh)* **104**, 233–239.
- Jacob JC, Gastal EL, Gastal MO, Carvalho GR, Beg MA, Ginther OJ, 2009: Temporal relationships and repeatability of follicle diameters and hormone concentrations within individuals in mares. *Reprod Domest Anim* **44**, 92–99.
- Killick S, Elstein M, 1987: Pharmacologic production of luteinized unruptured follicles by prostaglandin synthetase inhibitors. *Fertil Steril* **47**, 773–777.
- Li Q, Jimenez-Krassel F, Kobayashi Y, Ireland JJ, Smith GW, 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**, 533–543.
- Martinez-Bovi R, Cuervo-Arango J, 2016: Intrafollicular treatment with prostaglandins PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub>α inhibits the formation of luteinized unruptured follicles and restores normal ovulation in mares treated with flunixin-meglumine. *Equine Vet J* **48**, 211–217.
- Meinecke B, Gips H, Meinecke-Tillmann S, 1987: Progestagen, androgen and oestrogen levels in plasma and ovarian follicular fluid during the oestrous cycle of the mare. *Anim Reprod Sci* **12**, 255–265.
- Niswender GD, Nett TM, 1988: The corpus luteum and its control. *The Physiology of Reproduction*: 489–525.
- Palmer E, Terqui M, 1977: The measurement of total plasma oestrogens during the follicular phase of the mare's oestrous cycle. *Theriogenology* **7**, 331–338.
- Pattison ML, Chen CL, Kelley ST, Brandt GW, 1974: Luteinizing hormone and estradiol in peripheral blood of mares during estrous cycle. *Biol Reprod* **11**, 245–250.
- Richards JS, 1994: Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* **15**, 725–751.
- Robker RL, Russell DL, Yoshioka S, Sharma SC, Lydon JP, O'Malley BW, Espey LL, Richards JS, 2000: Ovulation: a multi-gene, multi-step process. *Steroids* **65**, 559–570.
- Sirois J, Dore 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**, 4427–4434.
- Sirois J, Sayasith K, Brown KA, Stock AE, Bouchard N, Dore M, 2004: Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. *Hum Reprod Update* **10**, 373–385.
- Sogn JH, Curry TE Jr, Brannstrom M, Lemaire WJ, Koos RD, Papkoff H, Janson PO, 1987: Inhibition of follicle-stimulating hormone-induced ovulation by indomethacin in the perfused rat ovary. *Biol Reprod* **36**, 536–542.
- Townson DH, Pierson RA, Ginther OJ, 1989: Characterization of plasma progesterone concentrations for two distinct luteal morphologies in mares. *Theriogenology* **32**, 197–204.
- Tsafirri A, Lindner HR, Zor U, Lamprecht SA, 1972: Physiological role of prostaglandins in the induction of ovulation. *Prostaglandins* **2**, 1–10.

**Submitted: 26 Dec 2015; Accepted: 4 Feb 2016**

**Author's address (for correspondence):** Juan Cuervo-Arango, Facultad de Veterinaria, Departamento Medicina y Cirugía Animal, Universidad CEU Cardenal Herrera, C/Tirant lo Blanc, 7. 46115 Alfara del Patriarca, Valencia, Spain.  
E-mail: juan.cuervo@uch.ceu.es

# APÉNDICE

---





**Journal Data Filtered By: Selected JCR Year: 2015 Selected Editions:  
SCIE Selected Categories: 'VETERINARY SCIENCES' Selected Category  
Scheme: WoS**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Cuartile
1	Annual Review of Animal Biosciences	223	4.348	Q1
2	FISH & SHELLFISH IMMUNOLOGY	10,252	3.025	Q1
3	VETERINARY RESEARCH	3,880	2.928	Q1
4	Transboundary and Emerging Diseases	1,306	2.714	Q1
5	MEDICAL MYCOLOGY	3,422	2.644	Q1
6	Zoonoses and Public Health	1,315	2.574	Q1
7	VETERINARY MICROBIOLOGY	13,340	2.564	Q1
8	EQUINE VETERINARY JOURNAL	5,633	2.475	Q1
9	Veterinary and Comparative Oncology	595	2.452	Q1
10	MEDICAL AND VETERINARY ENTOMOLOGY	2,899	2.242	Q1
10	VETERINARY PARASITOLOGY	14,419	2.242	Q1
12	PREVENTIVE VETERINARY MEDICINE	5,277	2.182	Q1
13	VETERINARY PATHOLOGY	4,593	2.120	Q1
14	ILAR JOURNAL	1,307	2.077	Q1
15	JOURNAL OF FISH DISEASES	3,776	2.053	Q1
16	COMPARATIVE IMMUNOLOGY MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES	1,367	1.943	Q1
17	THERIOGENOLOGY	13,110	1.838	Q1
18	JOURNAL OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE	6,181	1.821	Q1
19	APPLIED ANIMAL BEHAVIOUR SCIENCE	7,369	1.795	Q1
20	ANIMAL PRACTICE	1,438	1.775	Q1
21	DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS	5,379	1.770	Q1
22	VETERINARY RECORD	9,231	1.741	Q1
23	VETERINARY OPHTHALMOLOGY	1,883	1.736	Q1
24	JOURNAL OF MEDICAL ENTOMOLOGY	7,128	1.712	Q1
25	VETERINARY JOURNAL	6,456	1.680	Q1
26	VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY	6,035	1.664	Q1
27	BMC Veterinary Research	2,325	1.643	Q1
28	VETERINARY DERMATOLOGY	1,463	1.568	Q1
29	LABORATORY ANIMALS	1,669	1.553	Q1
30	Animal	3,411	1.508	Q1
31	RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE	5,054	1.504	Q1
32	MEDICAL ASSOCIATION	10,770	1.501	Q1
33	ANIMAL HEALTH RESEARCH REVIEWS	769	1.500	Q1
34	VETERINARY ANAESTHESIA AND ANALGESIA	1,344	1.485	Q1

35	Journal of Veterinary Behavior-Clinical Applications and Research	688	1.366	Q1
36	AVIAN PATHOLOGY	2,807	1.336	Q2
37	VETERINARY SURGERY	3,345	1.295	Q2
38	THERAPEUTICS	2,070	1.279	Q2
39	JOURNAL OF SWINE HEALTH AND PRODUCTION	354	1.277	Q2
40	EXPERIMENTAL ANIMALS	812	1.247	Q2
41	ACTA VETERINARIA SCANDINAVICA	1,644	1.230	Q2
42	NUTRITION	1,719	1.212	Q2
43	JOURNAL OF FELINE MEDICINE AND SURGERY	1,762	1.211	Q2
44	REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS	3,508	1.210	Q2
45	JOURNAL OF VETERINARY DIAGNOSTIC INVESTIGATION	3,425	1.196	Q2
46	JOURNAL OF WILDLIFE DISEASES	4,172	1.189	Q2
47	JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY	2,862	1.173	Q2
48	AMERICAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH	8,583	1.124	Q2
49	CARE	1,041	1.122	Q2
50	AVIAN DISEASES	4,292	1.104	Q2
51	NEW ZEALAND VETERINARY JOURNAL	1,527	1.080	Q2
52	Journal of Veterinary Science	888	1.076	Q2
53	VETERINARY CLINICAL PATHOLOGY	1,402	1.069	Q2
54	ANIMAL PRACTICE	2,149	1.049	Q2
55	VETERINARY QUARTERLY	783	1.047	Q2
56	COMPARATIVE MEDICINE	1,148	1.000	Q2
57	REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINARIA	747	0.990	Q2
58	VETERINARY RESEARCH COMMUNICATIONS	1,641	0.988	Q2
59	JOURNAL OF SMALL ANIMAL PRACTICE	2,730	0.976	Q2
60	Topics in Companion Animal Medicine	273	0.960	Q2
61	ZOO BIOLOGY	1,256	0.953	Q2
62	JOURNAL OF APPLIED ANIMAL WELFARE SCIENCE	446	0.936	Q2
63	JOURNAL OF MEDICAL PRIMATOLOGY	725	0.930	Q2
64	VETERINARY RADIOLOGY & ULTRASOUND	2,067	0.926	Q2
65	PRACTICE	870	0.921	Q2
66	Journal of the American Association for Laboratory Animal Science	892	0.906	Q2
67	REVUE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE-OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES	2,031	0.904	Q2
68	JOURNAL OF VETERINARY MEDICAL EDUCATION	600	0.901	Q2
69	ACTA VETERINARIA HUNGARICA	606	0.871	Q2
70	TROPICAL ANIMAL HEALTH AND PRODUCTION	2,212	0.870	Q3
71	JOURNAL OF AQUATIC ANIMAL HEALTH	938	0.859	Q3
72	TRAUMATOLOGY	916	0.853	Q3
73	Veterinaria Italiana	492	0.843	Q3
74	Italian Journal of Animal Science	964	0.841	Q3

75	ANIMAL WELFARE	1,519	0.824	Q3
75	IRISH VETERINARY JOURNAL	310	0.824	Q3
77	JOURNAL OF VETERINARY MEDICAL SCIENCE	3,571	0.822	Q3
77	PAKISTAN VETERINARY JOURNAL	720	0.822	Q3
79	CANADIAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH-REVUE CANADIENNE DE RECHERCHE VETERINAIRE	1,284	0.804	Q3
80	ASSOCIATION	1,961	0.793	Q3
81	Inra Productions Animales	184	0.767	Q3
82	ACTA VETERINARIA-BEOGRAD	224	0.741	Q3
83	JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE	1,110	0.730	Q3
84	ANTHROZOOS	810	0.725	Q3
85	POLISH JOURNAL OF VETERINARY SCIENCES	628	0.719	Q3
86	WIENER TIERARZTLICHE MONATSSCHRIFT	224	0.717	Q3
87	AUSTRALIAN VETERINARY JOURNAL	2,606	0.699	Q3
88	LAB ANIMAL	369	0.681	Q3
89	WOCHENSCHRIFT	674	0.650	Q3
90	CANADIENNE	2,506	0.639	Q3
91	Journal of Veterinary Cardiology	421	0.631	Q3
92	ANATOMIA HISTOLOGIA EMBRYOLOGIA	723	0.615	Q3
93	ONDERSTEPOORT JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH	970	0.603	Q3
94	FISH PATHOLOGY	763	0.600	Q3
95	EQUINE VETERINARY EDUCATION	841	0.569	Q3
96	VETERINARNI MEDICINA	989	0.560	Q3
97	JOURNAL OF AVIAN MEDICINE AND SURGERY	416	0.552	Q3
98	JOURNAL OF VETERINARY DENTISTRY	219	0.536	Q3
99	SCHWEIZER ARCHIV FUR TIERHEILKUNDE	470	0.492	Q3
100	BULLETIN OF THE VETERINARY INSTITUTE IN PULAWY	554	0.468	Q3
101	ACTA VETERINARIA BRNO	654	0.442	Q3
102	Journal of the South African Veterinary Association	683	0.441	Q3
103	Journal of Animal and Plant Sciences	721	0.422	Q3
104	JOURNAL OF ZOO AND WILDLIFE MEDICINE	1,479	0.421	Q4
105	Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi	563	0.418	Q4
106	REVISTA BRASILEIRA DE ZOOTECNIA-BRAZILIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE	3,317	0.412	Q4
107	Journal of Exotic Pet Medicine	231	0.396	Q4
108	TURKISH JOURNAL OF VETERINARY & ANIMAL SCIENCES	854	0.352	Q4
109	PFERDEHEILKUNDE	341	0.339	Q4
110	PESQUISA VETERINARIA BRASILEIRA	860	0.335	Q4
111	Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society	48	0.326	Q4
112	SOCIETY & ANIMALS	430	0.323	Q4
113	VETERINARSKI ARHIV	355	0.321	Q4
114	REVUE DE MEDECINE VETERINAIRE	637	0.319	Q4
115	TIERARZTLICHE PRAXIS	475	0.305	Q4

116	VETERINARIA MEXICO	121	0.294	Q4
117	ISRAEL JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE	134	0.293	Q4
118	Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi	172	0.288	Q4
119	ARCHIVOS DE MEDICINA VETERINARIA	245	0.275	Q4
120	JAPANESE JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH	185	0.270	Q4
121	Thai Journal of Veterinary Medicine	116	0.257	Q4
122	MAGYAR ALLATORVOSOK LAPJA	168	0.212	Q4
123	ZOOTECNIA	1,112	0.210	Q4
124	VLAAMS DIERGENEESKUNDIG TIJDSCHRIFT	113	0.203	Q4
125	Acta Scientiae Veterinariae	222	0.198	Q4
126	Medycyna Weterynaryjna-Veterinary Medicine-Science and Practice	450	0.195	Q4
127	Iranian Journal of Veterinary Research	172	0.167	Q4
128	International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine	208	0.159	Q4
129	IN PRACTICE	246	0.117	Q4
129	VETERINARIAS	189	0.117	Q4
131	CATTLE PRACTICE	134	0.115	Q4
132	Medicina Veterinaria-Recife	9	0.100	Q4
133	Slovenian Veterinary Research	55	0.091	Q4
134	TIERAERZTLICHE UMSCHAU	123	0.079	Q4
135	JOURNAL OF CAMEL PRACTICE AND RESEARCH	116	0.027	Q4
136	KLEINTIERPRAXIS	108	0.020	Q4
137	IPPOLOGIA	15	0.000	Q4
137	SCIENCE	91	0.000	Q4

Copyright © 2016 Thomson Reuters







