

FRECUENCIA, MORFOLOGÍA Y CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA *in vitro* DE CUERPOS LÚTEOS CAVITARIOS DE OVEJAS

FREQUENCY, MORPHOLOGY, AND *in vitro* PROGESTERONE CONCENTRATION OF EWES CAVITARY *CORPUS LUTEUM*

Cristina Tolentino-Castro, Leonor Miranda-Jiménez*, Adrián R. Quero-Carrillo, Nazario Pescador-Salas

Ganadería. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México, (cristina.tolentino@colpos.mx), (miranda_leonor@yahoo.com), (queroadrian@colpos.mx).

RESUMEN

El cuerpo lúteo (CL) puede desarrollarse como una estructura compacta o cavitaria. Pero no se conoce si hay diferencias en las características morfofisiológicas entre los cuerpos lúteos compactos (CLsCom) y los cuerpos lúteos cavitarios (CLsCav), ni si estas características están determinadas por el tipo, ovejas de lana (OL) versus ovejas de pelo (OP). Por lo tanto, en este estudio ovarios de ovejas se recolectaron después del sacrificio, y se obtuvieron 81 cuerpos lúteos OL y 81 OP. El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial 2x2 de tratamientos. Las variables evaluadas fueron frecuencia, morfología macroscópica y microscópica y producción de progesterona (P₄) *in vitro*, en 0.1 g de tejido lúteo, con o sin adición de 350 UI de eCG. La frecuencia de CLsCav fue mayor ($p \leq 0.05$) en OP (50.6 %) que en OL (35.8 %). Los CLsCav tuvieron tamaño menor ($p \leq 0.05$) que los CLsCom. La concentración de P₄ durante el cultivo tanto para CLsCav como para CLsCom de OL y OP, con y sin eCG, fue similar ($p > 0.05$). Los CLsCav de OP tuvieron menos células por campo visual (19) y tamaño mayor (25 μm) que los CLsCom (25.6 y 15 μm ; $p \leq 0.05$). Los OP tuvieron porcentaje mayor de CLsCav que los OL. El tamaño de los CLsCav fue menor que el de los CLCom y la producción de progesterona *in vitro* fue similar entre los CLsCav y los CLCom.

Palabras clave: Cuerpo lúteo, ovejas, progesterona.

INTRODUCCIÓN

El cuerpo lúteo (CL) es una glándula endocrina transitoria formada por las estructuras foliculares, después de la liberación del óvulo

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: agosto, 2014. Aprobado: marzo, 2015.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 49: 267-275. 2015.

ABSTRACT

The corpus luteum (CL) may develop as a compact or cavitary structure. But it is unknown whether the morphophysiological characteristics of compact corpora lutea (CLsCom) differ from that of cavitary corpora lutea (CLsCav), neither if these characteristics are determined by type, wool producing ewes (ewe of wool - OL) versus hair ewe (ewe of wool - OP). Therefore, in our study ovaries were collected from sacrificed ewes and 81 corpora lutea were obtained from OL and 81 from OP. The experimental design was completely randomized with a 2x2 factorial arrangement of treatments. The variables evaluated were frequency, macroscopic and microscopic morphology, and production of progesterone (P₄) *in vitro*, in 0.1 g luteum tissue, with or without addition of 350 IU of eCG. The frequency of CLsCav was higher ($p \leq 0.05$) in OP (50.6 %) than in OL (35.8 %). The CLsCav were smaller ($p \leq 0.05$) than the CLsCom. The P₄ concentration in CLsCav and CLsCom of both types, with or without eCG, was similar ($p > 0.05$) throughout culturing. The CLsCav from OP had fewer cells per visual field (19) and were larger (25 μm) than CLsCom cells (25.6 and 15 μm ; $p \leq 0.05$). Hair ewes had a higher percentage of CLsCav than wool ewes. The CLsCav were smaller than the CLCom and *in vitro* progesterone production of the two types of CL was similar.

Key words: *Corpus luteum*, ewes, progesterone.

INTRODUCTION

The corpus luteum (CL) is a transitory endocrine gland formed from follicular structures (Olivera *et al.*, 2007; Stocco *et al.*, 2007). It can be compact or cavitary (Kito *et al.*, 1986; Kastelic *et al.*, 1990; Perez-Marin, 2009). The cavity varies in size and may contain liquid, in some

(Olivera *et al.*, 2007; Stocco *et al.*, 2007) y puede presentarse como estructura compacta o cavitaria (Kito *et al.*, 1986; Kastelic *et al.*, 1990; Perez-Marin, 2009). La cavidad en algunos CLs puede variar en tamaño, contener líquido en su interior, reducir su tamaño al avanzar el ciclo estral, y aún puede desaparecer por completo (Kito *et al.*, 1986; Kastelic *et al.*, 1990).

La presencia de cavidad reduce el área de tejido lúteo y con ello la cantidad de progesterona producida por cuerpos lúteos cavitarios (CLsCav) también podría reducirse. Sin embargo, en vacas (Kito *et al.*, 1986; García y Salahdine, 2000), ovejas (González *et al.*, 2000) y cabras (Hernández *et al.*, 2003; Simões *et al.*, 2005), el tamaño de la cavidad central y la disminución en el área de tejido lúteo no afectan la producción de progesterona y por lo tanto, tampoco la fertilidad, el porcentaje de concepción o la supervivencia embrionaria (Hernández *et al.*, 2003).

En la literatura parece no estar documentado si la concentración de progesterona se mantiene sólo por el CL cavitario (CLsCav), o si los CL compactos (CLsCom) son un refuerzo para esta concentración. Además, en los estudios se usó observación sonográfica de la estructura y determinaciones sanguíneas de las concentraciones de progesterona; pero esta metodología podría no dilucidar la producción real de progesterona por CLsCav. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue identificar la morfología, la frecuencia y la secreción de P4 *in vitro*, de cuerpos lúteos CLsCav y CLsCom, en ovejas de lana (OL) y ovejas de pelo (OP). La hipótesis fue que los CLsCav y los CLsCom difieren en frecuencia de presentación, características morfológicas y respuesta en secreción *in vitro* de P4 por la adición de eCG, entre OL y OP.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en el km 36.5 de la carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México. Para este fin, se recolectaron ovarios OL y OP de ovejas en mataderos oficiales ubicados en el municipio de Capuluc y Texcoco, Estado de México.

Recolección de material biológico

Los ovarios con CL se obtuvieron de manera directa de las canales, inmediatamente después del sacrificio de las ovejas. Para su transporte, los ovarios se colocaron en un contenedor con hielo

CLs, they can become smaller as the estrus cycle progresses and can even disappear completely (Kito *et al.*, 1986; Kastelic *et al.*, 1990).

Presence of the cavity reduces the luteum tissue area and, consequently, the amount of progesterone produced by the cavitary corpora lutea (CLsCav) may also decrease. However, in cows (Kito *et al.*, 1986; García and Salahdine, 2000), ewes (González *et al.*, 2000) and goat does (Hernández *et al.*, 2003; Simões *et al.*, 2005), the size of the central cavity and the reduction in the luteum tissue area do not affect progesterone production; and therefore, fertility, percentage of conception or embryo survival (Hernández *et al.*, 2003).

The literature does not seem to document whether the progesterone concentration is maintained only by cavitary CL (CLsCav), or whether compact CL (CLsCom) reinforce the concentration. Besides, in the studies, sonography was used to observe the structure and blood samples to determine progesterone concentrations. However, such methodology may not be able to determine real progesterone production by the CLsCav. For this reason, the objective of this study was to identify the morphology, frequency and secretion of P4 *in vitro* of the corpora lutea CLsCav and CLsCom from wool ewes (OL) and hair ewes (OP). The hypothesis was that the CLsCav and CLsCom from OL and OP differ in frequency of occurrence, morphological characteristics and in P4 *in vitro* secretion response to addition of eCG, between OL and OP.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out at the Animal Reproduction Laboratory of the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, located at km 36.5 on the Mexico-Texcoco highway, Montecillo, Texcoco, Estado de México. For this purpose, ovaries from OL and OP of ewes were collected at government slaughterhouses located at the municipalities of Capuluc and Texcoco, Estado de México.

Collection of biological material

Ovaries with CL were obtained directly from ewe carcasses immediately after sacrifice. For their transport to the laboratory, the ovaries were placed in a container with ice and a broad-spectrum antibiotic saline solution (0.001 mg 10 mL⁻¹). In the laboratory, the ovaries were washed, and tissue different from the ovary was removed; all of the CL were dissected. To determine the

y solución salina más antibiótico de amplio espectro (0.001 mg 10 mL⁻¹). En el laboratorio los ovarios se lavaron, limpiaron de tejido diferente al ovario y se diseccionaron todos los CL. Para determinar la frecuencia de los CLsCav, se separaron 81 CL de OL y 81 CL de OP del resto de tejido ovárico y se seccionaron por la mitad con bisturí, clasificándolos por ausencia o presencia de cavidad, en CLsCom y CLsCav.

Morfología del CL

Las características de tamaño y forma se evaluaron en 76 CLsCav o CLsCom de OL y OP. Los CLs se pesaron con balanza analítica (Mettler HK 160, capacidad máxima 160 g). Con vernier y regla flexible se midió el perímetro mayor (considerando la medida al incluir las partes internas y extruida de la estructura), el perímetro menor (sólo la parte del CL interna al ovario), la longitud, la anchura y el grosor.

También se midió el tamaño de las células lúteas. Para esto, los CLs diseccionados y limpios se fijaron en paraformaldehído al 4 % por 18 h, se incluyeron en parafina, se tiñeron con hematoxilina eosina y se observaron en un microscopio compuesto (Axiom Optic 3005, Imagine Optic Inc., 1 Broadway, 14th floor, Cambridge, MA 02142, USA), con objetivo 40x. Las fotografías se tomaron con los objetivos 20X y 40X, y se estableció una escala en el objetivo para medición posterior.

Quantificación hormonal

El cultivo de 0.1 g de tejido, de cada uno de 60 CLsCav y CLsCom, de ambos tipos de ovejas se usó para determinar la producción de P4 *in vitro*. En total, se colocaron 32 CLsCav y 28 CLsCom de ambos tipos de ovejas, en tubos de ensaye y se incubaron con 6 mL de medio de cultivo (Dulbecco's) más 0.001 mg 10 mL⁻¹ antibiótico de amplio espectro (Rofloxacin). A 16 CLsCav y 14 CLsCom se adicionó eCG (Cuadro 1).

El cultivo se mantuvo 36 h a 37 °C, alícuotas de 1 mL del medio de cultivo en el tiempo 0 (al iniciar el cultivo), después de 15 min y 6, 12 y 36 h se conservaron a -20 °C hasta la evaluación de P4 mediante radioinmunoanálisis (RIA) de fase sólida. Para este análisis se usó el kit comercial de Siemens (EE.UU.) con sensibilidad de 0.08 ng mL⁻¹ y coeficiente de variación intra e interensayo de 3.4 % y 7.8 %, respectivamente. Las muestras se analizaron en el Laboratorio de Hormonas Proteicas, del Departamento de Biología de la Reproducción, en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, México D. F.

Análisis de datos

La frecuencia de cuerpos lúteos compactos o cavitarios en OL y OP se analizó con estadística descriptiva. Para el tamaño, la forma y la producción de P4 *in vitro* el diseño experimental fue

frequency of the CLsCav, 81 CL from OL and 81 from OP were separated from the rest of the ovarian tissue and cross-sectioned at the middle with a scalpel. The CL were classified by absence or presence of the cavity into CLsCom and CLsCav.

CL morphology

Size and shape of the CL were evaluated in 76 CLsCav or CLsCom from OL and OP. The CLs were weighed on an analytical balance (Mettler HK 160, maximum capacity 160 g). With a Vernier and flexible ruler the larger perimeter (considering the measurement when internal and extruded parts of the structure were included) and the smaller perimeter (only the part of the CL that was internal in the ovary), length, width and thickness, were measured.

Besides luteum cell size was measured. To obtain these data, clean dissected CLs were fixed in 4 % paraformaldehyde for 18 h and then in paraffin and dyed with hemotoxylin eosin. Cells were then observed under a compound microscope (Axiom Optic 3005, Imagine Optic Inc., 1 Broadway, 14th floor, Cambridge, MA 02142, USA) with 40x objective. Photographs were taken with the objectives 20x and 40x, and a scale was established in the objective for later measurements.

Hormone quantification

Cultured tissue (0.1 g) from each of 60 CLsCav and CLsCom from both breeds was used to determine *in vitro* P4 production. A total of 32 CLsCav and 28 CLsCom from both types of ewes were placed in test tubes and incubated with 6 mL culture medium (Dulbecco's) plus 0.001 mg 10 mL⁻¹ broad spectrum antibiotic (Rofloxacin). Equine chorionic gonadotropin (eCG) was added to 16 CLsCav and 14 CLsCom (Table 1).

The culture was kept for 36 h at 37 °C. Aliquots of 1 mL of culture medium at 0 time (when culture began), after 15 min, and after 6, 12 and 36 h were stored at -20 °C until P4 evaluation with solid phase radioimmunoassay (RIA). For this analysis, the Siemens commercial kit (USA) was used. The kit has a sensitivity of 0.08 ng mL⁻¹ and a coefficient of variation intra- and inter-assay of 3.4 % and 7.8 %, respectively. The samples were analyzed in the Protein Hormone Laboratory of the Department of Reproduction Biology of the Salvador Zubirán National Institute of Medical and Nutrition Sciences (Laboratorio de Hormonas Proteicas, del Departamento de Biología de la Reproducción, en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán), México, D. F.

Data analysis

The frequency of compact or cavitary corpora lutea in OL and OP was analyzed with descriptive statistics. For size,

completamente al azar con arreglo factorial 2x2 de tratamientos: tipo de oveja (de lana y de pelo) y tipo CL (compacto y cavitario) como factores. Las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las variables fueron el peso, el perímetro, la longitud, la anchura, el grosor, el largo de las células lúteas y la producción de progesterona, de los tiempos de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La frecuencia en porcentaje, de CLsCom y de CLsCav de OL y OP mostró diferencias ($p \leq 0.05$). Para OL se obtuvieron 29 (35.8 %) CLsCav de los 81 CLs y 64.2 % de CLsCom. En OP se observó 50.6 % CLsCav y 49.4 % CLsCom. En OL la relación CLsCom:CLsCav fue 2:1, y en OP fue 1:1. Esto indica que la eficiencia reproductiva superior de los OP sobre los OL podría tener un componente basado en el tipo de CL, su morfología y eficiencia en secreción hormonal.

La frecuencia mayor de CLsCav en OP, respecto a la encontrada en OL, coincide con el 33.3 % de cavidades centrales en borregas Merino Español (Gonzalez de Bulnes *et al.* (2000). Hernández *et al.*, 2003) reportan 48 % de CLsCav en cabras. Ambos estudios fueron realizados con ultrasonografía transrectal. Las variaciones entre estos estudios y el nuestro pueden deberse a la especie, tipo, etapa del ciclo estral y técnica de evaluación. Al respecto, Simões *et al.* (2005) indican que la técnica de ultrasonografía es menos precisa cuando se compara con técnicas directas. Es conveniente señalar que en nuestra investigación la observación fue directa y los resultados son similares a los de los otros estudios. En bovinos Kito *et al.* (1986) reportan 37.2 % CLsCav y García y Salaheddine (2000) 41 %; en ambos estudios la evaluación se realizó mediante ultrasonido. Los datos en bovinos muestran variabilidad similar que en rumiantes pequeños. Por lo tanto, las técnicas directas no son más precisas que las indirectas y la variabilidad en frecuencia reportada para CLsCav se debe a otros factores, especie o tipo, como en el presente estudio.

Los CLsCav tuvieron tamaño menor ($p \leq 0.05$) respecto a CLsCom (Cuadro 2 y 3). Además, los CLs de OP fueron pequeños sin importar si eran cavitarios o compactos en comparación con los CLs de OL. Así, estos resultados indican que el tamaño del CL depende del tipo de CLs y del tipo de oveja.

La concentración promedio de P4, por unidad de tejido, durante el cultivo, tanto para CLsCav como

Cuadro 1. Arreglo de tratamientos para la evaluación de cuerpos lúteos cavitarios o compactos de ovejas productoras de lana y de pelo, con presencia o ausencia de eCG.

Table 1. Treatments arrangement for evaluation of cavitary or compact corpora lutea from wool and hair ewes, with presence or absence of eCG.

Tipo de oveja	Tipo de CL	eCG de 350 UI	Repeticiones
OL	cavitario	Con	8
		Sin	8
	compacto	Con	6
		Sin	6
OP	cavitario	Con	8
		Sin	8
	compacto	Con	8
		Sin	8

OL: oveja de lana, OP: oveja de pelo, eCG: gonadotropina coriónica equina, UI: unidades internacionales, Repeticiones: número de CLs en cada combinación ♦ OL: wool producing ewe, OP: hair ewe, eCG: equine chorionic gonadotropin, UI: international units, Replications: number of CLs in each combination.

shape and *in vitro* P4 production, the experimental design was completely randomized with a 2x2 factorial arrangement of treatments: type of ewe (wool or hair ewe) and type of CL (compact or cavitary). Treatment means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$). The variables were weight, perimeter, length, width, and thickness of CL, length of luteal cells, and production of progesterone through culture times.

RESULTS AND DISCUSSION

Percentage frequencies of CLsCom and CLsCav from OL and OP were different ($p \leq 0.05$). Of the 81 CLs from wool ewes, 29 (35.8 %) were CLsCav and 64.2 % were CLsCom. In hair ewes 50.6 % were CLsCav and 49.4 % were CLsCom. The ratio CLsCom:CLsCav in wool ewes was 2:1, and in hair ewes it was 1:1, indicating that the superior reproductive efficiency of hair ewe over wool ewe could be a component based on the type of CL, its morphology and hormone secretion efficiency.

The higher frequency of CLsCav in OP, relative to that found in OL, coincides with the 33.3 % CLs with central cavities from Spanish Merino ewes (González de Bulnes *et al.* (2000). Hernández *et al.*, 2003) report 48 % CLsCav in goats. Both studies were conducted with transrectal ultrasonography. The differences

Cuadro 2. Morfometría de cuerpos lúteos diseccionados de ovejas de lana.**Table 2. Morphometry of dissected corpora lutea from wool ewes.**

CL	PM	DE	Pm	DE	Peso	DE	Lar	DE	An	DE	Gro	DE
Com	3.3 a	0.30	3.2 a	0.3	0.5 a	0.1	1.2 a	0.1	1.0 a	0.1	0.8 a	0.1
Cavi	2.6 b	0.58	2.6 b	0.7	0.3 b	0.2	0.8 b	0.2	0.8 b	0.2	0.6 b	0.2

CL: cuerpo lúteo, com: compacto, cavi: cavitario; PM: perímetro mayor incluyendo parte extruida e interna al ovario; Pm: perímetro menor tomado de la parte interna al ovario; DE: desviación estándar; Lar: largo; An: ancho; Gro: grosor. Medidas de longitud en centímetros y de masa en gramos. Medias con letra diferente en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$) ♦ CL: corpus luteum, com: compact, cavi: cavitary; PM: larger perimeter includes extruded and internal parts of the ovary; Pm: smaller perimeter taken from the internal part of the ovary; DE: standard deviation; Lar: length; An: width; Gro: thickness. Measurements of length are in centimeters and of mass are in grams. Means with different letters in a column are statistically different (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 3. Morfometría de cuerpos lúteos diseccionados de ovejas de pelo.**Table 3. Morphometry of dissected corpora lutea from hair ewes.**

CL	PM	DE	Pm	DE	Pe	DE	La	DE	An	DE	Gru	DE
Com	2.6 a	0.5	2.7 a	0.5	0.3 a	0.1	1.0 a	0.1	0.8 a	0.1	0.7 a	0.1
Cav	2.4 b	0.7	2.2 b	0.7	0.1 b	0.1	0.8 b	0.2	0.7 b	0.2	0.6 b	0.2

CL: cuerpo lúteo, comp: compacto, cavit: cavitario; PM: perímetro mayor incluyendo parte extruida y la interna al ovario; Pm: perímetro menor tomada de la parte interna al ovario. DE: desviación estándar. Medidas de longitud son en centímetros y de masa en gramos. Medias con letra diferente en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$) ♦ CL: corpus luteum, com: compact, cavi: cavitary; PM: larger perimeter includes extruded and internal parts of the ovary; Pm: smaller perimeter taken from the internal part of the ovary; DE: standard deviation; Lar: length; An: width; Gro: thickness. Measurements of length are in centimeters and of mass are in grams. Means with different letters in a column are statistically different (Tukey, $p \leq 0.05$).

para CLsCom de OL y OP, con y sin aplicación de eCG, no fue diferente ($p > 0.05$; Cuadro 4). Esto es un indicador de posible actividad compensatoria en los CLsCav. Sin embargo la concentración de P4 sí fue influenciada por el tiempo de cultivo ($p \leq 0.05$): al inicio y después de 6 h fue mínima y a las 24 h fue máxima en OP. En contraste, OL presentaron producción máxima de esta hormona a las 12 h (Figura 1). Estos resultados muestran diferencias en concentración máxima de progesterona *in vitro* influenciada por el tipo de oveja.

La producción de P4 no difiere por tipo de CL. En contraste, García y Salaheddine (2000) reportan que el tamaño de la cavidad localizada en el cuerpo lúteo sí influye en el mantenimiento de la gestación en hembras bovinas. Si el mantenimiento de la gestación depende por completo de la concentración de P4 secretada por el CL, los resultados de nuestro estudio difieren de los de García y Salaheddine (2000), aunque el objetivo de nuestro estudio no fue constatar dicha alteración en ovejas.

between these studies and our may be due to species, breed, stage of the estrus cycle, or evaluation technique. In this respect, Simões *et al.* (2005) indicate that the ultrasonographic technique is less precise than direct techniques. It should be pointed out that our study was conducted through direct observation and the results are similar to those of other studies. In cattle, Kito *et al.* (1986) report 37.2 % CLsCav, whereas García and Salaheddine (2000) reported 41 %. The two studies were done using ultrasound. The data on cattle show variability similar to that in small ruminants. Therefore, direct techniques are no more precise than indirect techniques and the variability in frequency reported for CLsCav is due to other factors such as species or breed, as occurred in our study.

The CLsCav were smaller ($p \leq 0.05$) than CLsCom (Tables 2 and 3). Corpora lutea from hair ewe were smaller than those from wool ewe regardless of whether they were cavitary or compact. Thus, these results indicate that the size of the CL depends on the type of CL and the type of ewe.

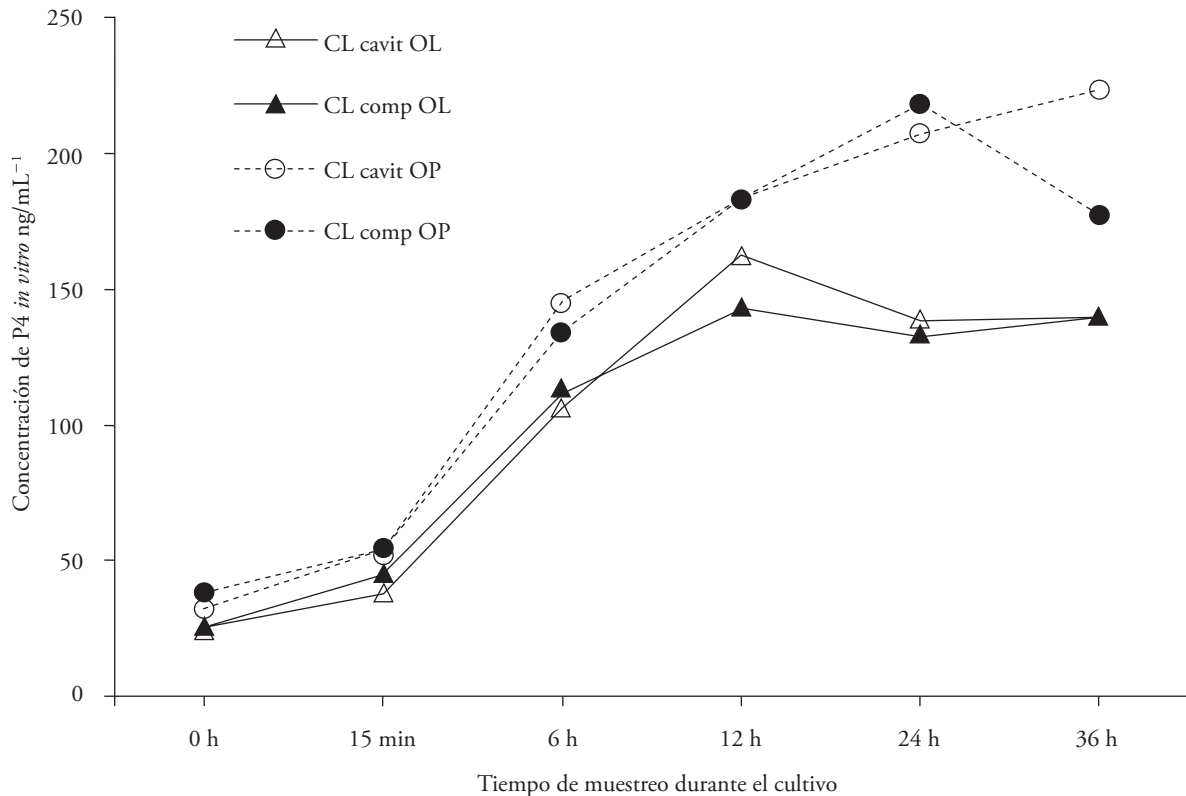
Cuadro 4. Concentración media de progesterona (P4) por 0.1 g de tejido lúteo, proveniente de cuerpos lúteos cavitarios y cuerpos lúteos compactos, con o sin adición de gonadotropina coriónica equina (eCG) e incubación por 36 h.
Table 4. Mean concentration of progesterone (P4) per 0.1 g of luteum tissue from cavitory and compact corpora lutea, with and without addition of equine chorionic gonadotropin (eCG), incubated for 36 h.

CL	eCG	P4 (ng mL ⁻¹) OL	DE	P4 (ng mL ⁻¹) OP	DE
Comp	con	102.39a	21.23	148.91a	24.26
Comp	sin	97.95a	21.23	119.73a	24.26
Cavit	con	94.21a	18.38	141.05a	24.26
Cavit	sin	109.36a	18.38	140.04a	24.26

Comp: compacto; cavit=cavitario CL: cuerpo lúteo; eCG: gonadotropina coriónica equina; OL: ovejas de lana; OP: ovejas de pelo; DE: desviación estándar. Medias con letra diferente en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05). ♦ Comp: compact; Cavit: cavitory; CL: corpus luteum; eCG: equine chorionic gonadotropin; OL: wool producing sheep; OP: hair sheep; DE: standard deviation. Means with different letters in a columns are statistically different (Tukey, p≤0.05).

La falta de progesterona debido al tipo de cuerpo lúteo coincidió con lo reportado por Kito *et al.* (1986) en vacas, pues indica que los CLsCav contenían tejido lúteo mayor y secreción mayor de P4, en comparación con CLs compactos. Pero, lo anterior se

There were no differences (p>0.05; Table 4) between CLsCav and CLsCom from OL and OP in average P4 concentration per unit of tissue during culture, with and without application of eCG. This is an indication of possible compensatory activity in the



CL: cuerpo lúteo; cavit: cavitario; comp: compacto; OL: ovejas de lana; OP: ovejas de pelo. ♦ CL: corpus luteum; cavit: cavitory; comp: compact; OL: wool producing sheep; OP: hair sheep.

Figura 1. Concentración de progesterona (P4) de cuerpos lúteos incubados durante 36 h.
Figure 1. Progesterone (P4) concentration from corpora lutea incubated for 36 h.

relaciona con patologías, como la presencia de quistes luteínicos (Foley, 1995).

En nuestro estudio, la concentración de P4 según el tipo de oveja indicó que los OP produjeron más P4, a pesar de ser pequeños, respecto a OL ($p \leq 0.05$). La producción mayor de P4 *in vitro* se registró en el cultivo después de 12 h en OL, y después de 24 h en OP.

Para determinar si la diferencia en concentración de P4 se debía a alteraciones en el tejido lúteo, se obtuvieron preparaciones histológicas de CLCav y CLsCom de OL y OP teñidas con hematoxilina-eosina. En ellas se observó que los CLsCav de OP contenían número promedio menor de células por campo visual (40x; 19 células) y éstas tuvieron tamaño mayor (25 μm); mientras que el número y tamaño celular de CLsCom fue de 25.6 y 15 μm ($p \leq 0.05$; Figura 2). Sin embargo, la concentración de P4 al inicio y durante el cultivo no fue diferente respecto al tipo de CL ($p > 0.05$). Lo anterior puede deberse a que CLsCav, a pesar de tener masa menor, sufrieron cambios celulares que incluyeron el tamaño (hipertrofia) y eficiencia productiva mayor de P4, lo cual compensó la falta de tejido y promovió la eficiencia en la adquisición de mayor cantidad de elementos involucrados en la síntesis de P4.

Estudios histológicos en vacas no muestran diferencias en el tamaño celular, pero sí en la producción de P4 (Okuda *et al.*, 1988), aunque P4 no fue evaluada en condiciones de cultivo, como en nuestra investigación. El número reducido de células en CLs cavitarios por campo visual obtenido en nuestro estudio difiere del resultado de Grygar *et al.* (1997), quienes reportan que el área de tejido lúteo en CLs cavitarios de vacas fue mayor. Si se considera que un área mayor de tejido puede corresponder al número mayor de células y producción de P4, los resultados serían contrarios con lo documentado en nuestro estudio.

CONCLUSIONES

La frecuencia de los CLsCav varió en relación al tipo de oveja y fueron más frecuentes en ovejas de pelo que en ovejas de lana. Además, sin importar el tipo de oveja, el tamaño de los CLsCav fue menor en comparación con los CLCom. La producción de progesterona *in vitro* fue similar entre los CLsCav y los CLCom.

CLsCav. However, there was an effect of culture time ($p \leq 0.05$) on P4 concentration: at the beginning and up to 6 h, it was minimal and reached a maximum level at 24 h in OP. In contrast, in OL maximum production of the hormone occurred at 12 h (Figure 1). These results show that differences in maximum *in vitro* progesterone was influenced by type of ewes.

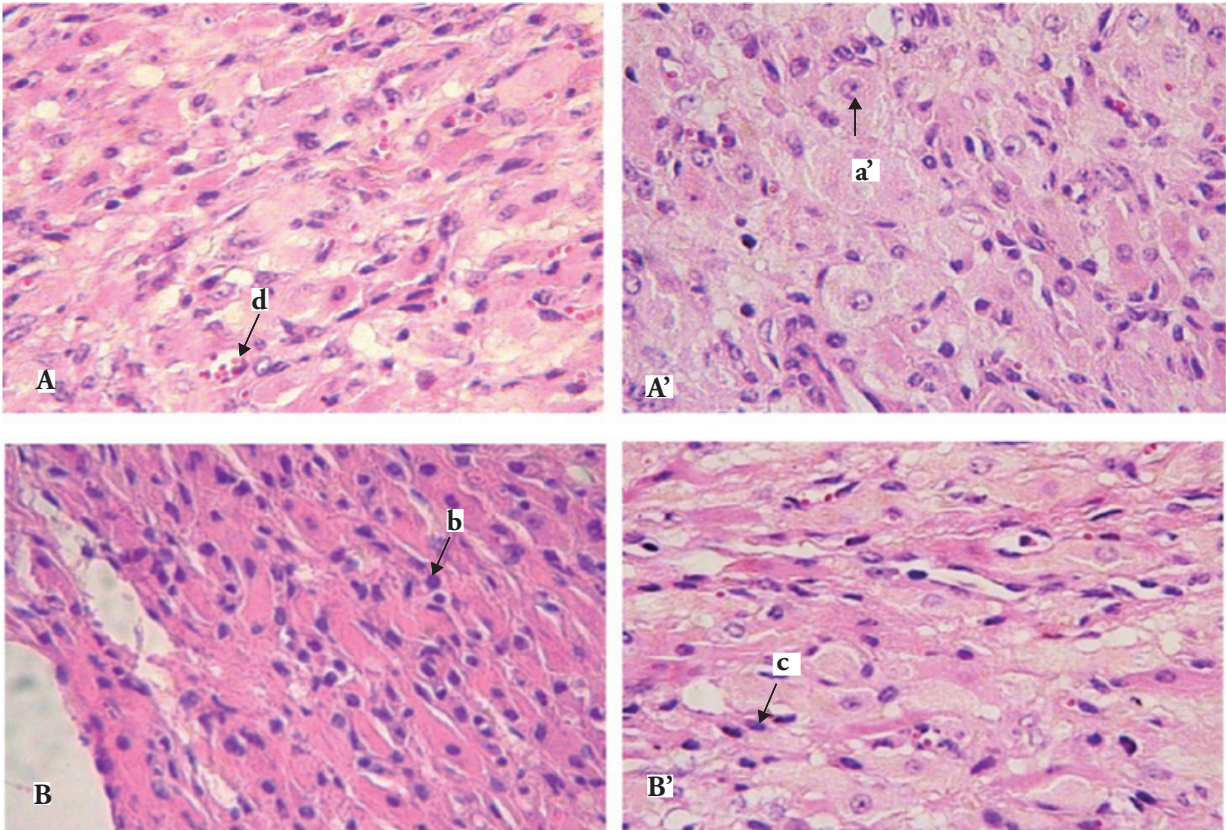
Production of P4, did not differ by type of CL. In contrast, García and Salaheddine (2000) report that the size of the cavity located in the corpus luteum influences maintenance of pregnancy in cows. If maintenance of pregnancy depends completely on the concentration of P4 secreted by the CL, the results of our study differ from García and Salaheddine (2000), although our study did not aim to confirm this type of alteration in ewes.

The lack of progesterone due to the type of corpus luteum coincided with that reported by Kito *et al.* (1986), in cows, because it indicates that the CLsCav contain more luteum tissue and secrete more P4 than compact CLs. This, however, is related to pathologies such as the presence of luteinic cysts (Foley, 1995).

In our study, the P4 concentration according to the type of ewe showed that despite being smaller, CLs from OP produced more P4 ($p \leq 0.05$) than those from OL. The highest *in vitro* production of P4 in the culture was registered after 12 h with CL from OL, and after 24 h with CL from OP.

To determine whether the difference in P4 concentration was due to alterations in luteum tissue, histological preparations of CLCav and CLsCom from OL and OP dyed with hematoxylin eosin were obtained. In these preparations, it was observed that the CLsCav from OP contained a lower average number of cells per visual field (40x; 19 cells), but they were larger (25 μm), whereas the number and size of the CLsCom cells were 25.6 and 15 μm ($p \leq 0.05$; Figure 2). However, the P4 concentration at the beginning and during culture was not different by effect of CL type ($p > 0.05$). This may be because the CLsCav, in spite of having a smaller mass, underwent changes in their cells that included size (hypertrophy) and greater P4 productive efficiency, which compensated for the lack of tissue and promoted efficiency in the acquisition of a larger amount of the elements involved in P4 synthesis.

Histological studies with cows do not show differences in cell size, but there are differences in P4 production (Okuda *et al.*, 1988), although this



CL: cuerpo lúteo, A: CL compacto de oveja de lana. A': CL cavitario de oveja de lana. B: CL compacto de oveja de pelo. B': CL cavitario de oveja de pelo. a: células con núcleo redondo; b: células con núcleos prominentes; c: células con núcleos alargados; d: vasos sanguíneos.
 ♦ CL: corpus luteum. A: compact CL from wool ewe. A': cavitary CL from wool ewe. B: compact CL from hair ewe. B': cavitary CL from hair ewe. a: cells with round nuclei; b: cells with prominent nuclei; c: cells with elongated nuclei; d: blood vessels.

Figura 2. Imagen de cuerpos lúteos compactos y cavitarios (40X), tinción de hematoxilina y eosina.
Figure 2. Image of compact and cavitary corpora lutea (40X), dyed with hematoxylin and eosin.

LITERATURA CITADA

- Foley, G. L. 1996. Pathology of the corpus luteum of cows. *The-riogenology* 45:1413-1428
- García, A., and M. Salaheddine. 2000. Ultrasonic morphology of the corpus lutea and central luteal cavities during selection of recipients for embryo transfer. *Reprod. Dom. Anim.* 35: 113-118.
- González de Bulnes, A., J. M. Santiago, B. A. Gómez, and S. A. López. 2000. Relationship between ultrasonographic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration during the oestrous cycle in monovular ewes. *Reprod. Dom. Anim.* 35: 65-68.
- Grygar, I., E. Kudlac, R. Dolezel, and J. Nedbalkova. 1997. Vo-lume of luteal tissue and concentration of serum progesterone in cows bearing homogeneous corpus luteum or corpus luteum with cavity. *Anim. Reprod. Sci.* 49: 77-82.

was not evaluated in *in vitro* culture conditions, as in our study. The small number of cells per visual field in cavitary CLs obtained in our study is different to the result from Grygar *et al.* (1997), who report that the area of luteum tissue in cavitary CLs from cows was greater. If we consider that a larger area of tissue would correspond to a larger number of cells and higher P4 production, the results would be contrary to those documented in our study.

CONCLUSIONS

Frequency of CLsCav varied according to type of ewe. They were more frequent in hair ewe than

- Hernández C. J., Y. M. Domínguez, J. A. Rodríguez García, y C.G. Gutiérrez. 2003. Frecuencia de cuerpos lúteos cavitarios y su relación con la fertilidad en cabras. *Arch. Zootec.* 52: 389-392.
- Kastelic, J. R., R. A. Pierson, and O. J. Ginther. 1990. Ultrasonic morphology of corpora lutea and central cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. *Theriogenology* 34: 487-498.
- Kito, S., K. Okuda, K. Miyazawa, and K. Sato. 1986. Study on the appearance of the cavity in the corpus luteum of cows by using ultrasonic scanning. *Theriogenology* 25:325- 333.
- Stocco, C., C. Telleria, and G. Gibori. 2007. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr. Rev.* 28: 117-149.
- Olivera A. M., A. M. Tarazona, T. C. Ruíz, y C. E. M. Giraldo. 2007. Vías implicadas en la luteólisis bovina. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 20: 387-393.
- Okuda, K., S. Kito, N. Sumi, and K. Sato. 1988. A study of the central cavity in the bovine corpus luteum. *Vet. Record* 123: 180-183.

in wool ewe. Regardless of type of ewe, the CLsCav were smaller than CLCom. *In vitro* production of progesterone by both CLsCav and CLsCom was similar.

End of the English version



- Perez-Marin, C. 2009. Formation of corpora lutea and central luteal cavities and their relationship with plasma progesterone levels and other metabolic parameters in dairy cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 44: 384-389.
- Simões, J., J. Potes, J. Azevedo, J. C. Almeida, P. Fontes, G. Baril, and R. Mascarenhas. 2005. Morphometry of ovarian structures by transrectal ultrasonography in Serrana goats. *Anim. Reprod. Sci.* 85: 263-373.