

## CONTENIDO

### Artículos de revisión

#### *Review articles*

Comportamiento reproductivo de la yegua

*Reproductive behavior in the mare*

María del Sol Méndez Bernal, Francisco Guadalupe Méndez Bernal,  
Federico de la Colina Flores, Francisco Javier Escobar  
Medina.....

135-147

Estudio recapitulativo sobre fracturas en pequeñas especies y su resolución

*Review of fractures in small animals and its resolution*

Mirna Elizabeth Aguilar Faz, Sergio Vázquez Salinas, Francisco Javier  
Escobar Medina.....

149-173

### Artículos científicos

#### *Original research articles*

Evaluación de la inmunidad pasiva en becerros bajo condiciones de  
estabulación, mediante la determinación de proteínas plasmáticas

*Evaluation of passive immunity in female calves in stabling conditions  
through plasma protein determination*

Oswaldo Ulises Jiménez de la Cruz, Federico de la Colina Flores, Francisco  
Javier Escobar Medina.....

175-182

Evaluación de un implante liberador de progesterona (CIDR) reutilizado  
hasta en dos ocasiones para la sincronización de hembras bovinas receptoras  
en la transferencia de embriones

*Utilization of new or reused once or twice Controlled Intravaginal Device  
Progesterone-Releaser (CIDR) to synchronize recipient bovine females in  
embryo transfer programs*

Noel Artemio Mela Osorio, Francisco Javier Escobar Medina, Carlos  
Fernando Aréchiga Flores, Federico de la Colina Flores.....

183-188

## EVALUACIÓN DE UN IMPLANTE LIBERADOR DE PROGESTERONA (CIDR) REUTILIZADO HASTA EN DOS OCASIONES PARA LA SINCRONIZACIÓN DE HEMBRAS BOVINAS RECEPTORAS EN LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

Noel Artemio Mela Osorio, Francisco Javier Escobar Medina, Carlos Fernando Aréchiga Flores, Federico de la Colina Flores

E-mail: [fescobar@uaz.edu.mx](mailto:fescobar@uaz.edu.mx).

### RESUMEN

Se evaluó la capacidad de sincronización del celo con implantes intravaginales liberadores de progesterona (CIDR) reutilizados hasta en dos ocasiones en 90 hembras receptoras Pardo Suizo x Brahman y Simental x Brahman. Los implantes permanecieron en su sitio durante 7 días. Además, el día de su colocación se aplicaron 2 mg de Benzoato de estradiol y 2 ml de cloprostenol en el momento de su retirada, por vía intramuscular. Las hembras se observaron de 45 – 49 h, 51 – 55 h y 57 – 62 horas después de la retirada del implante para identificar la presencia de celos. Se emplearon implantes con diferente grado de utilización: nuevos en 30 vaquillas vírgenes y 3 (escala: 1-5) de condición corporal, reutilizados en 25 vaquillas y 5 vacas de 1-5 partos (condición corporal = 5), y reutilizados en dos ocasiones en 15 vaquillas y 15 vacas. A las hembras se les transfirieron embriones 7 días después del celo, y ese día se identificó la presencia de cuerpos lúteos. El diagnóstico de gestación se realizó 60 días después del celo. El 93.3%, 86.7% y 73.3% de las hembras presentaron celo de 29 a 33 horas después de retirar el implante en los animales tratados con CIDR nuevo y con una y dos reutilizaciones, respectivamente. En el mismo orden, el 90%, 83.3% y 83.3% presentaron cuerpo lúteo en el momento de la transferencia embrionaria. El 63.3% se diagnosticó gestante en las hembras con implante nuevo, 56.7 % en las tratadas con implantes de una reutilización y 60% en las hembras con dos reutilizaciones. Se concluye que el implante liberador de progesterona (CIDR) se puede utilizar hasta en dos ocasiones para sincronizar hembras bovinas receptoras empleadas en la transferencia de embriones.

Palabras clave: CIDR, reutilización, vacas receptoras

---

Veterinaria Zacatecas 2010; 3: 183-188

### INTRODUCCIÓN

La biotecnología en el ganado bovino se ha utilizado con eficiencia para el mejoramiento genético, particularmente mediante las técnicas que conducen a la transferencia embrionaria.<sup>1-3</sup>

En estas técnicas se utiliza la superovulación<sup>4-7</sup> de vacas especializadas en la producción de leche o carne con alta calidad genética (vacas donadoras), e inseminadas con artificialmente con semen procedente de machos también de alta calidad genética.<sup>8</sup>

Siete días después de la inseminación, los embriones se recolectan, evalúan y se transfieren a vacas receptoras (generalmente de baja calidad genética); las cuales previamente se sincronizan para coincidir en los estados reproductivos de donadoras y receptoras: recolección y transferencia a los 7 días después del celo.<sup>9</sup> Por tanto, el reconocimiento de la gestación,

implantación y desarrollo fetal hasta el parto se realiza en las receptoras.<sup>10</sup>

Las hembras receptoras se sincronizan por medio de tratamientos hormonales, generalmente se aplican implantes con liberación de progesterona durante 7 días. En el momento de colocar el implante se inyecta benzoato de estradiol para provocar la destrucción de los cuerpos lúteos y prostaglandina F2 $\alpha$  al retirarlo con el mismo fin, entre otros tratamientos.<sup>11</sup>

De las vacas donadora se puede obtener numerosa descendencia en cada año, de la calidad genética de sus padres biológicos pero con sus correspondientes costos de producción, que actualmente son elevados y por consiguiente una técnica prohibitiva para productores de bajos ingresos.

En todas las partes del proceso se ha tratado de reducir los costos de producción para utilizarlo con productores incluso de bajos ingresos. Los costos se pueden reducir, entre otras

partes del proceso, mediante la utilización y reutilización de los implantes liberadores de progesterona en las vacas receptoras, las cuales podrían pertenecer a los productores de menores ingresos y con esto contribuir al avance de la calidad genética en sus hatos. El presente trabajo se realizó con el propósito de evaluar la utilización y reutilización de un producto liberador de progesterona (CIDR) para la sincronización de hembras bovinas receptoras en la transferencia de embriones.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Centro de Reproducción Genético Ganadero SA, localizado en Santiago de Veragua, República de Panamá.

Se utilizaron 90 hembras Pardo Suizo x Brahman y Simental x Brahman, las cuales se sincronizaron como receptoras de la siguiente manera. El día 0 se les aplicó un implante intravaginal liberador de progesterona de 1.9 g (CIDR, PFIZER ®) y 2 mg de Benzoato de estradiol por vía intramuscular. En el día 7 se retiró el CIDR y se aplicaron 2 ml de cloprostenol (Agropharma ®), por vía intramuscular, para provocar la destrucción de los cuerpos lúteos. Dos días después de esto se realizó la detección del celo en las hembras durante tres períodos; el primero de las 5 a las 9 de la mañana, el segundo de las 11 de la mañana a las 3 de la tarde, y el tercero de las 5 de la tarde a las 9 de la noche, lo cual equivale a 45 – 49 h, 51 – 55 h y 57 – 62 horas después de la retirada del CIDR, respectivamente.

La sincronización se realizó con CIDR de diferente grado de utilización. En el primer grupo se utilizó un CIDR nuevo y se constituía por 30 vaquillas vírgenes. En el segundo grupo se aplicó un CIDR previamente utilizado en otros trabajos y contaba con 25 vaquillas y 5 vacas de 1 a 5 partos; entre las vacas se encontraban 2 que se habían empleado para sincronizaciones previas sin haberseles encontrado cuerpos lúteos en el momento de la transferencia embrionaria. En el último grupo se aplicó un CIDR con 2 utilizaciones previas y se formaba con 15 vaquillas y 15 vacas de 1 a 5 partos, entre las cuales 4 se habían empleado para sincronizaciones previas sin haberseles encontrado cuerpos lúteos en el momento de la transferencia embrionaria. Las sincronizaciones previas se habían realizado 8 meses antes del inicio del presente trabajo.

La condición corporal de las vaquillas era de 3 (escala: 1-5) y las vacas presentaban cierto grado de obesidad (condición corporal = 5).

A cada hembra se le transfirió un embrión el día 7, el cual previamente se obtuvo de vacas donadoras, raza Brahman y, por medio de palpación rectal, se les determinó la presencia de cuerpo lúteo. El diagnóstico de gestación se realizó 60 días después de la detección del celo, por medio de ultrasonografía.

## Procesamiento de datos

Para comprobar si los celos se presentaron de manera uniforme y aleatoria dentro del período de observación, se utilizó una prueba de bondad de ajuste multinomial basada en las  $X^2$  de Pearson que se distribuyen de acuerdo a la  $x^2$ .

Para probar si la fertilidad y la reutilización hasta en 2 veces del CIDR son independientes, se utilizó una prueba de bondad de ajuste para tablas de contingencia basada en la  $X^2$  de Pearson que se distribuye como  $x^2$ .

## RESULTADOS

En el Cuadro 1 se presenta el porcentaje de hembras con presentación de celo después de la retirada del CIDR. El 93.3%, 86.7% y 73.3% presentaron celo de 29 a 33 horas después de su retirada en los animales tratados con CIDR nuevo y con una y dos reutilizaciones, respectivamente. Ninguna con CIDR nuevo presentó celo posteriormente, el 10% lo hicieron en las tratadas con implante de una reutilización de las 35 a 39 horas después de su retirada y ninguna posteriormente y, finalmente el 16.7% presentaron celo en el segundo período de observación para la detección de celos en las hembras con CIDR de 2da reutilización y ninguna posteriormente. Los animales restantes en cada grupo no mostraron o no se identificaron en celo durante el período destinado para la detección. Por lo tanto, el celo se detectó en el 93.3%, 96.7% y 90% de las hembras con CIDR nuevo y con una y dos reutilizaciones, respectivamente. En general, el 84.4% de las hembras presentaron celo durante el primer período de observación y el 8.89% en el segundo período.

El 90%, 83.3% y 83.3% de las hembras presentaron cuerpo lúteo en el momento de la transferencia embrionaria en los grupos con CIDR nuevo y con una y dos reutilizaciones, respectivamente. En general, al 85.6% de las

hembras se les diagnosticó la presencia de cuerpos lúteos (Cuadro 2).

El 63.3% se diagnosticó gestante a los 60 días después del celo en las hembras con CIDR nuevo, el 56.7% lo hizo en las tratadas con

implante de una reutilización y el 60% en las hembras con 2 reutilizaciones. En general, al 60% de las hembras se les diagnosticó gestación. Los detalles de esta información se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 1. Porcentaje vacas con manifestación de celo después de la retirada del CIDR y aplicación del Cloprostenol. Entre paréntesis el número de vacas.			
Horas después CIDR	45 - 49 h	51 – 55 h	General
Nuevo	(28) 93.3	(0) 0.00	(28) 93.3
1ª reutilización	(26) 86.7	(3) 10.0	(29) 96.7
2ª reutilización	(22) 73.3	(5) 16.7	(27) 90.0
General	(76) 84.4	(8) 8.89	(84) 93.3

Cuadro 2. Porcentaje de hembras con cuerpo lúteo en el momento de la transferencia embrionaria y porcentaje de gestantes, con relación a las hembras que presentaron celo. Entre paréntesis el número de vacas.		
CIDR	Vacas con cuerpo lúteo	Vacas gestantes
Nuevo	(27) 96.4	(19) 67.9
1ª reutilización	(25) 86.2	(17) 58.6
2ª reutilización	(25) 92.6	(18) 66.7
General	(77) 91.7	(54) 64.3

## DISCUSIÓN

El 93.3% de las hembras tratadas con CIDR nuevo manifestaron celo durante el primer período de observación, las restantes de este grupo no lo hicieron en ningún momento; el 86.7% presentaron estro con CIDR de 1 reutilización y el

73.3% con 2 reutilizaciones. En el segundo período, el 10% y 16.7% lo hicieron en los grupos de CIDR con una y dos reutilizaciones, respectivamente. Por lo tanto, en la mayoría de los casos, es decir el 93.3%, 96.7% y 90% se sincronizó la presentación del celo en un período de 10 horas (de 45 a 55 h después de retirar el

implante). Las diferencias encontradas en la presentación del celo con relación a la retirada del implante se pudieron deber al estado metabólico de los animales, la liberación hormonal de los implantes, la eficiencia del estradiol para desencadenar el proceso de la luteólisis y características propias de cada hembra.

En el grupo tratado con CIDR de 2 reutilizaciones se encontraban las hembras con mayor capacidad metabólica, se componía con 15 vaquillas y 15 vacas, las vacas con mayor edad y condición corporal que las vaquillas. Menor porcentaje de hembras presentaron celo en el primer período de observación y mayor porcentaje durante el segundo período. El grupo con CIDR nuevo se integraba con vaquillas vírgenes únicamente, animales de menor capacidad metabólica que los miembros del grupo anterior. Las hembras con implante de 1 reutilización presentaron valores intermedios de capacidad metabólica y manifestación del estro. El incremento de la capacidad metabólica del animal aumenta la capacidad para eliminar las hormonas y por consiguiente se reduce su concentración en la circulación sanguínea y su efecto en el órgano blanco.<sup>12-14</sup> Por lo tanto, mayor eliminación de estradiol de origen ovárico aumento del retardo en la presentación del estro.

Por otro lado, la progesterona ejerce retroalimentación negativa sobre hipotálamo para reducir la secreción tónica de GnRH y por consiguiente la secreción tónica de gonadotropinas en hipófisis, y con esto disminuir la producción de estradiol en el folículo ovárico.<sup>15,16</sup> Por lo tanto, a mayor liberación hormonal, como probablemente sucedió en las hembras con CIDR nuevo, más retroalimentación negativa; consecuentemente menor secreción ovárica de estradiol y mayor número de oleadas de crecimiento folicular. La presentación del celo dependería del crecimiento folicular al retirar el implante, vacas con mayor desarrollo folicular deberían manifestar el celo antes que las hembras con folículos de menor tamaño. En el caso contrario, baja liberación hormonal, como se esperaría sucediera con los implantes reutilizados una y dos veces, disminución de la retroalimentación negativa de la progesterona y por consiguiente mayor producción ovárica de estradiol y cese de las oleadas de crecimiento folicular; el folículo dominante no perdería su dominancia y en el momento de retirar el implante su producción de estradiol adelantaría el momento

del celo, pero así no sucedió. Por lo tanto, esta posibilidad es la menor probable.

El resultado anterior podría presentarse bajo un escenario diferente. El implante liberar la hormona suficientemente elevada, en los tres grupos, para impedir la ovulación, pero lo suficientemente baja para permitir la permanencia del folículo dominante. El resultado, en los ovarios, al momento de retirar el implante en los tres grupos, se encontraría un folículo dominante, y el celo se presentara de acuerdo al comportamiento característico de cada hembra; no todas las hembras manifiestan el celo con la misma intensidad.

La baja eficiencia del estradiol para desencadenar el proceso de luteólisis constituiría otra posibilidad. Por lo tanto, algunas hembras estarían bajo la influencia hormonal endógena, la progesterona producida en el cuerpo lúteo no destruido por el estradiol, y la exógena, hormona del implante. La retroalimentación negativa sobre hipotálamo se realizaría de manera más eficiente con la presencia subsecuente de las oleadas de crecimiento folicular y el efecto discutido anteriormente.

Lo importante fue que el CIDR empleado para el presente trabajo, nuevo y de primera y segunda reutilización, liberó suficiente progesterona para simular la función del cuerpo lúteo y ejercer retroalimentación negativa sobre hipotálamo, con lo cual se impidió la secreción cíclica de GnRH y por consiguiente la secreción preovulatoria de LH; se suprimió la ovulación y las hembras manifestaron en celo en forma sincronizada después de retirar el implante, todas las que lo hicieron lo realizaron en un período de 10 horas.

De las hembras que mostraron celo, al 91.7% se les diagnosticó la presencia de cuerpo lúteo en el momento de realizar la transferencia embrionaria, y el 64.3% habían realizado el reconocimiento de la gestación y la implantación embrionaria, por lo cual, dos meses después del celo, se diagnosticaron gestantes. El tratamiento puede influir sobre la presencia de cuerpo lúteo a los 7 días después del celo, pero difícilmente sobre la gestación.

La ausencia de cuerpo lúteo se debe a secreción anticipada de prostaglandina F<sub>2α</sub>, y generalmente se manifiesta en las hembras con nivel elevado de estradiol en el ciclo previo debido a ovulaciones provenientes de folículos de mayor tamaño,<sup>17</sup> como probablemente sucedió en las hembras del presente trabajo y discutido

anteriormente. Sin embargo, fueron muy pocas las hembras con luteólisis prematura, 8.3% en general, y en las restantes, que constituyeron la mayoría, fue posible la transferencia de embriones debido al desarrollo de cuerpos lúteos normales. Por lo tanto, los tratamientos no influyeron de manera importante sobre la secreción anticipada de prostaglandina F2 $\alpha$ .

### CONCLUSIÓN

El implante liberador de progesterona (CIDR) reutilizado hasta en dos ocasiones sincronizó las hembras bovinas receptoras empleadas en transferencia de embriones.

### REFERENCIAS

1. Pashen R. Biotechnology. The key to improved animal production? *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1987; 3: 647-656.
2. Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 2003; 59: 599-616.
3. Baruselli PS, Ferreira RM, Filho MF, Nasser LF, Rodrigues CA, Bó GA. Bovine embryo transfer recipient synchronization and management in tropical environments. *Reprod Fertil Develop* 2010; 22: 67-74.
4. Monniaux D, Chupin D, Saumande J. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 1983; 19: 55-81.
5. Kelly P, Duffy P, Roche JF, Boland MP. Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Anim Reprod Sci* 1997; 46: 1-14.
6. Im SK, Woo JS, Jean GJ, Chang SS, Kang SW, Yun SK, Son DS. Superovulation in Korean cattle with a single subcutaneous injection of Follitropin-V dissolved in polyethylenglicol. *Korean J Emb Trans* 1998; 13: 207-212.
7. Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42: 601-611.
8. Seidel G Jr, Seidel SM. Training manual for embryo transfer in cattle. *FAO Animal Production and Health Paper 77*, Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1991.
9. Lonergan P. State-of-the-art embryo technologies in cattle. *Soc Reprod Fert Suppl* 2007; 64: 315-325.
10. Greve T. Practical aspects of embryo transplantation in cattle. *Br Vet J* 1986; 142: 228-232.
11. Hasler JF. Concurrent status and potential of embryos transfer and reproductive technology in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1992; 75: 2857-2879.
12. Rabiee AR, Dalley D, Borman JM, Macmillan KL, Schwarzenberger F. Progesterone clearance rate in lactating dairy cows with two levels of dry matter and metabolisable energy intakes. *Anim Reprod Sci* 2002a; 72: 11-25.
13. Rabiee AR, Macmillan KL, Schwarzenberger F, Wright PJ. Effects of level of feeding and progesterone dose on plasma and fecal progesterone in ovariectomized cows. *Anim Reprod Sci* 2002b; 73: 185-195.
14. Sangsritavong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE, Wiltbank MC. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 $\beta$  in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2002; 85: 2831-2842.
15. Bergfeld EG, Kojima FN, Cupp AS, Wehrman ME, Peters KE, Mariscal V, Sanchez T, Kinder JE. Changing dose of progesterone results in sudden change in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17-b-estradiol in bovine females. *Biol Reprod* 1996; 54: 546-553.
16. Lüttgenau J, Beindorff N, Ulbrich SE, Kastelic JP, Bollwein H. Low plasma progesterone concentrations are accompanied by reduced luteal blood flow and increased size of the dominant follicle in dairy cows. *Theriogenology* (in press).
17. Inskeep EK. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentration of progesterone on embryonic survival in the cow. *J Anim Sci* 2004; 82 (Suppl E): E24-E39.

## ABSTRACT

**Mela-Osorio NA, Escobar-Medina FJ, Aréchiga-Flores CF, de la Colina-Flores F. Utilization of new or reused once or twice Controlled Intravaginal Device Progesterone-Releaser (CIDR) to synchronize recipient bovine females in embryo transfer programs.** Estrus synchronization response was evaluated using a new or recycled CIDR's (1x or 2x) in Brown Swiss or Simmental x Brahman cattle females crosses (n=90). CIDR's remained intravaginally during 7 d. At the time of CIDR implantation, an estradiol benzoate (EB 2ml, IM) was also administered. Estrus detection was performed at 45-49 h, 51-55 h and 57-62 h after CIDR removal. 1) New CIDR's were utilized in heifers (n=30; BCS=3; scale 1-5); Re-utilized CIDR's (1x) were utilized in heifers (n=25) and multiparous cows (n=5; BCS=5; 1-5 calvings), and re-used (2x) in heifers (n=15) and cows (n=15). Bovine females received an embryo 7 d after estrus detection and presence of corpora lutea was evaluated by rectal palpation. Pregnancy diagnosis was performed 60 d after estrus detection. Most of bovine females showed estrus 29-33 h after removal of new, used 1x or used 2x CIDR's (93.3%, 86.7% and 73.3%, respectively). In the same way, 90%, 83.3% and 83.3% showed at last one corpus luteum at the time of embryo transfer, respectively. Pregnancy diagnosis by rectal palpation was 63.3%, 56.7% y 60% by using new, re-used (1x) and re-used (2x) CIDR's, respectively. In conclusion, CIDR represent an option to synchronize estrus in recipient bovine females (F1: Brown Swiss or Simmental x Brahman crosses) included in embryo transfer programs, either as new CIDR or recycled ones or even twice.

**Veterinaria Zacatecas 2010; 3: 183-188**  
**Keywords: CIDR, re-used, recipient cows**

## EVALUACIÓN DE LA INMUNIDAD PASIVA EN BECERRAS BAJO CONDICIONES DE ESTABULACIÓN, MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Oswaldo Ulises Jiménez de la Cruz, Federico de la Colina Flores, Francisco Javier Escobar Medina.  
E-mail: [fescobar@uaz.edu.mx](mailto:fescobar@uaz.edu.mx)

### RESUMEN

Se evaluó la inmunidad pasiva en becerras Holstein en 8 establos de la cuenca lechera de Tizayuca, Hgo, mediante la determinación de proteínas plasmáticas. Las becerras se separaron de sus madres en el momento del nacimiento y las vacas se ordeñaron para obtener el calostro inmediatamente después del parto. Las becerras se alimentaron con 2 litros de calostro de 2 a 3 y de 14 a 15 horas de edad con botella provista con mamila tipo biberón. A las becerras se les tomaron muestras sanguíneas de 48 a 72 horas de edad para determinar la concentración de proteínas plasmáticas y hematocrito. Además, diariamente se visitaban los establos para registrar los animales enfermos y sus tratamientos; también se anotaron los animales fallecidos, con y sin sintomatología previa de enfermedad. El incremento de la concentración de proteínas plasmáticas redujo el riesgo a presentar alteraciones o enfermedades en las becerras. La concentración media de proteínas plasmáticas fue  $7.36 \pm 0.90$  (g/dL) en las hembras que permanecieron vivas sin alteraciones,  $6.71 \pm 1.19$  (g/dL) en las que permanecieron vivas con síntomas de enfermedades,  $6.70 \pm 0.73$  (g/dL) en las que murieron sin alteraciones previas y  $6.41 \pm 1.17$  (g/dL) en las que murieron con manifestación de enfermedades. Las muertes ocurrieron entre 2 y 3 semanas de edad de las becerras. Los valores medios de hematocrito fueron de  $34.73 \pm 7.47$ ,  $33.43 \pm 7.00$ ,  $23.50 \pm 7.42$  y  $33.38 \pm 4.24$  en las becerras que permanecieron vivas sin alteraciones, permanecieron vivas con síntomas de enfermedades, murieron sin alteraciones previas y murieron con manifestación de enfermedades, respectivamente. El valor en las que murieron sin previa manifestación de enfermedades fue estadísticamente diferente a las otras medias ( $P < 0.05$ ). Se concluye que el incremento en la concentración de proteínas plasmáticas redujo el riesgo a presentar alteraciones o enfermedades en las becerras del presente trabajo. Además, el nivel de proteínas plasmáticas fue superior a la concentración considerada como exitosa para la transferencia de inmunidad pasiva, incluso en las becerras con menor valor de hematocrito.

Palabras clave: inmunidad pasiva, proteínas plasmáticas, becerras

---

Veterinaria Zacatecas 2010; 3: 175-182

### INTRODUCCIÓN

La inmunidad pasiva es el proceso mediante el cual la vaca transfiere anticuerpos los becerros para asegurarles la sobrevivencia durante los primeros estadios de vida,<sup>1</sup> debido a que las madres no pueden transferírselos durante la gestación<sup>2</sup> y los becerros nacen con un sistema inmune inmaduro.<sup>3,4</sup> El mecanismo se lleva a cabo por medio del calostro, la primera producción mamaria después del parto.<sup>5</sup>

El proceso se realiza de manera continua pero se pueden establecer diferentes etapas: a) la madre produce calostro con determinado contenido de inmunoglobulinas,<sup>6</sup> b) el becerro lo toma como primer alimento<sup>7</sup> y c) las inmunoglobulinas se absorben en el intestino y pasan a la circulación sanguínea del recién nacido.<sup>8</sup> Por lo tanto, la eficiencia de la inmunidad

pasiva se relaciona con el contenido de inmunoglobulinas en el calostro, la cantidad ingerida de calostro en el primer día de vida del animal, la capacidad de absorción del recién nacido y la concentración de inmunoglobulinas en su circulación sanguínea.

Se dispone de técnicas para evaluar cada parte del proceso. En la práctica se utiliza principalmente la evaluación del calostro,<sup>9</sup> para ofrecer a los recién nacidos cantidad adecuada de calostro con suficiente contenido de inmunoglobulinas<sup>7</sup> y ofrecerlo en el momento favorable,<sup>8</sup> con esto se pretende asegurar la absorción de anticuerpos y facilitar la transferencia de inmunidad pasiva. La concentración de inmunoglobulinas en la circulación sanguínea no es una práctica frecuente debido a las dificultades para llevarla a cabo. Se requiere tomar la muestra en los animales,

conducirla al laboratorio y realizar su determinación mediante técnicas especiales.<sup>1,10</sup>

A través del calostro se transfieren tres tipos de inmunoglobulinas: IgG, IgM e IgA,<sup>11,12</sup> la IgG es la más abundante.<sup>3</sup> La inmunidad pasiva también se puede estimar por medio de la determinación de proteínas plasmáticas.<sup>10</sup> Se ha considerado entre 5.0 y 5.2 g/dL de proteínas plasmáticas como nivel adecuado para permitir a los becerros sin deshidratación enfrentar las agresiones del ambiente durante los primeros días de su vida, y 5.5 g/dL en los deshidratados.<sup>13</sup> Sería interesante realizar estas determinaciones para evaluar la eficiencia del proceso en becerras bajo las condiciones y la rutina del establo. El presente trabajo se realizó para evaluar la eficiencia de la inmunidad pasiva en becerras bajo las condiciones y rutina de establo, mediante la determinación de proteínas plasmáticas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en 8 establos de la cuenca lechera de Tizayuca, Hgo, en las becerras Holstein que nacieron entre los meses de enero y marzo (n=67); la temporada del año con menor incidencia de pariciones.

Las becerras se separaron de sus madres en el momento del nacimiento y se alojaron en becerreras individuales. Las vacas se ordeñaron para obtener el calostro inmediatamente después del parto. Las becerras se alimentaron con 2 litros de calostro, de 2 a 3 horas de edad, en botella provista con mamila tipo biberón; la dosis se repitió 12 horas después. El calostro procedía de sus madres y no se determinó su calidad.

En los días subsiguientes, las becerras recibieron como alimento leche de transición hasta la primera semana de edad. Posteriormente, se alimentaron con sustituto de leche comercial (Master Milk®, Alltech de México SA de CV). Todas estas prácticas las realizaban los encargados de los establos.

A las becerras se les tomaron muestras sanguíneas entre 48 y 72 horas de vida para determinar las proteínas plasmáticas y hematocrito. Las proteínas plasmáticas se determinaron por medio de refractometría.<sup>1</sup> Además, diariamente se visitaban los establos para registrar los animales enfermos y sus tratamientos; también se anotaron los animales fallecidos, con y sin sintomatología previa de enfermedad. Al identificar un animal enfermo se procedía a realizar el diagnóstico de la enfermedad y se

recomendaba el tratamiento que el Médico Veterinario Zootecnista consideró adecuado. Sin embargo, los encargados de los establos no siempre respetaban la decisión del Médico, por lo general aplicaban los productos disponibles que eran los utilizados tradicionalmente. Para las diarreas se aplicaba por lo regular enrofloxacin (Enroxil 10%®, Krka), 1 ml/20 Kg de peso del animal durante 5 días, por vía intramuscular; flumixin meglumina (Meglumine®, Tornel), 2 ml por cada 45 Kg de peso corporal, cada 24 horas por vía intramuscular, durante 4 días, y suero. Para las neumonías un producto con amoxicilina y gentamicina (Gentamox®, Hipra), 10 ml diariamente, por vía intramuscular.

La concentración de proteínas plasmáticas y hematocrito se analizaron con un modelo factorial 2 x 2, y se compararon de acuerdo a la presencia o ausencia de enfermedad y si murieron o no las becerras. Además, se realizó una regresión logística en donde se estudió el efecto de la concentración de proteínas plasmáticas, el hematocrito y la presencia de enfermedad sobre la sobrevivencia o muerte de las becerras. También se realizaron análisis de Kruskal-Wallis y de la mediana para comparar las combinaciones de enfermedad y muerte.

## RESULTADOS

Como se puede observar en el Cuadro 1, la concentración promedio de proteínas plasmáticas no difirió estadísticamente entre los grupos estudiados ( $P>0.05$ ). La concentración de proteínas plasmáticas tendió a reducirse en las becerras que murieron en comparación con las hembras que permanecieron vivas. De la misma manera, el valor de esta variable tendió a reducirse en las becerras con manifestación de enfermedad en comparación con las hembras sin alteraciones detectadas. Sólo una becerro presentó valor inferior a 5.2 g/dL de proteínas plasmáticas, lo cual equivale al 3% del total de los animales. Esta becerro padeció neumonía, no respondió al tratamiento y murió; en este caso no se realizó el análisis para la determinación de hematocrito.

Del total de los animales en estudio, el 80.6% permanecieron vivos y el 19.4% murieron.

En el Cuadro 2 se presentan la concentración mediana y los rangos intercuartílicos de las proteínas plasmáticas de las becerras en estudio. Se encontró efecto significativo ( $P=0.047$ ) por medio de la prueba de

Kruskual-Wallis. El promedio de rangos con esta prueba fue 21.7, 24.8, 26.9 y 38.5 en las becerras con manifestación de enfermedad y muerte, sin

alteraciones y muerte, con síntomas de enfermedad y permanecieron vivas y en las sanas con permanencia de vida, respectivamente.

Cuadro 1. Concentración media ( $\pm$ DE) de proteínas plasmáticas (g/dL) en becerras Holstein, alimentadas con calostro a las 2-3 y 14-15 horas de edad que permanecieron vivas o murieron, con y sin manifestaciones de enfermedad. Entre paréntesis el número de observaciones			
Variable	Permanecieron vivas	Murieron	General
Sin alteraciones detectadas	(46) 7.36 $\pm$ 0.90	(4) 6.70 $\pm$ 0.73	(50) 7.30 $\pm$ 0.90
Con manifestación de enfermedad	(8) 6.71 $\pm$ 1.19	(9) 6.41 $\pm$ 1.17	(17) 6.56 $\pm$ 1.15
General	(54) 7.26 $\pm$ 0.96	(13) 6.50 $\pm$ 1.03	(67) 7.11 $\pm$ 0.12

Cuadro 2. Concentración mediana y rango intercuartílico de proteínas plasmáticas (g/dL) en becerras Holstein, alimentadas con calostro a las 2-3 y 14-15 horas de edad que permanecieron vivas o murieron, con y sin manifestaciones de enfermedad.									
Variable	Permanecieron vivas			Murieron			General		
	Núm	Mediana	Rango	Núm	Mediana	Rango	Núm	Mediana	Rango
Sin alteraciones detectadas	46	7.40	1.1	4	6.90	1.4	50	7.35	1.1
Con manifestación de enfermedad	8	6.50	2.3	9	6.00	1.9	17	6.40	2.0
General	54	7.4	1.2	13	6.60	1.7	67	7.20	1.2
Prueba de Kruskal-Wallis (P = 0.047), prueba de la mediana (P = 0.177).									

Cuadro 3. Medias ( $\pm$  DE) del hematocrito en becerras Holstein, alimentadas con calostro a las 2-3 y 14-15 horas de edad que permanecieron vivas o murieron, con y sin manifestaciones de enfermedad. Entre paréntesis el número de observaciones

Variable	Permanecieron vivas	Murieron	General
Sin alteraciones detectadas	(41) 34.73 $\pm$ 7.47	(4) 23.50 $\pm$ 7.42*	(45) 33.73 $\pm$ 8.05
Con manifestación de enfermedad	(7) 33.43 $\pm$ 7.00	(8) 35.38 $\pm$ 4.24	(15) 34.47 $\pm$ 5.57
General	(48) 34.54 $\pm$ 7.34	(12) 31.42 $\pm$ 7.79	(60) 33.92 $\pm$ 7.47

\*Valor estadísticamente diferente a los otros promedios, excepto a los generales ( $P < 0.05$ )

Con la prueba de la mediana no se identificaron efectos significativos en la concentración de proteínas plasmáticas entre las becerras en estudio ( $P = 0.177$ ), pero el 22.2%, 25.0%, 37.5% y 56.5% presentaron valores por encima y el 77.8%, 75.0%, 62.5% y 43.5% por debajo ó igual a la mediana en las becerras con manifestación de enfermedades y muerte, sin alteraciones y muerte, con muestra de enfermedades y permanecieron vivas y las que permanecieron vivas sin alteraciones, respectivamente.

Conforme se incrementó la concentración de proteínas plasmáticas se redujo el riesgo de presentar alteraciones o enfermedades, por cada unidad el valor de momios correspondió a 0.61 ( $P = 0.019$ ).

El hematocrito fue significativamente ( $P < 0.05$ ) de menor valor en las becerras que murieron sin alteraciones detectadas en comparación con las hembras que permanecieron vivas con y sin manifestaciones de enfermedad y las que murieron con sintomatología. Los valores en los tres últimos grupos citados, el hematocrito no varió estadísticamente ( $P > 0.05$ ). Los detalles de esta información se presentan en el Cuadro 3. El valor del hematocrito no influyó sobre el riesgo de presentar enfermedades ( $P = 0.104$ ).

Las becerras murieron de 2 a 3 semanas de edad, generalmente con síntomas previos de

diarrea y neumonía en los casos donde se observaron alteraciones, y en otras ocasiones sin síntomas de enfermedad. La mayoría de esta información se obtuvo del encargado del establo.

El 47% de las becerras enfermas y tratadas se recuperaron con el tratamiento establecido por el Médico Veterinario Zootecnista encargado para este fin, el porcentaje restante no respondió favorablemente al tratamiento y murió.

El 8% de las becerras sin alteraciones murieron sin habersele detectado síntomas de enfermedades.

## DISCUSIÓN

En las becerras del presente trabajo, conforme se incrementó la concentración de proteínas plasmáticas se redujo el riesgo de presentar alteraciones o enfermedades; por cada unidad de incremento el valor de momios correspondió a 0.61 ( $P = 0.019$ ). Las becerras con menor nivel de proteínas plasmáticas enfermaron y algunas murieron; el incremento en el nivel de estas proteínas protegió los animales y no manifestaron enfermedades, permanecieron sanos durante el tiempo en que se realizó el estudio. Se registró la tendencia de presentar mayor concentración de proteínas plasmáticas en las becerras que permanecieron vivas sin alteraciones,

menor nivel en las hembras que murieron con manifestación de enfermedades y valores intermedios en las que permanecieron vivas con muestras de alteraciones. De la misma manera, la concentración mediana de proteínas plasmáticas y el promedio de rangos mediante la prueba de Kruskal-Wallis fueron mayores en las becerras que permanecieron vivas sin manifestación de enfermedades. En los otros animales se obtuvieron valores inferiores, el promedio de sus rangos se redujo ligeramente conforme se presentaron síntomas de enfermedades y muerte de los animales; con leve promedio mayor en las hembras con manifestación de enfermedades y permanecieron vivas, menor en las becerras con alteraciones y murieron, así como valores intermedios en los animales que murieron sin presentar sintomatología.

Aunque no se encontró efecto significativo con la prueba de la mediana en la concentración de proteínas plasmáticas entre las becerras en estudio ( $P = 0.177$ ), el 56.5% de los valores se localizaron por encima de la mediana en las hembras que permanecieron vivas sin manifestación de enfermedades, los mismos animales que mediante la prueba de Kruskal-Wallis presentaron mayor concentración de proteínas plasmáticas y mayor promedio de rangos.

Con base en el criterio establecido por Tyler *et al.*,<sup>14</sup> en donde con el nivel mínimo de 5.2 g/dL de proteínas plasmáticas se considera exitoso para la transferencia de inmunidad en becerras sin deshidratación, se podría tomar como adecuada transferencia en las hembras del presente trabajo; los promedios de estas proteínas fueron superiores 6.4 g/dL en todos los grupos. Lo cual demuestra la eficiencia del programa de manejo del calostro en los animales utilizados para este estudio; la mayoría, de acuerdo a los valores de hematocrito, no se encontraban deshidratados. Sólo una becerca presentó nivel inferior a 5.2 g/dL (4.8 g/dL) de proteínas plasmáticas, ésta enfermó de neumonía, no respondió al tratamiento y murió.

No todas las proteínas plasmáticas participan como anticuerpos en los recién nacidos, existen varios tipos de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM), la IgG es la inmunoglobulina predominante de transferencia entre madre y cría por medio del calostro.<sup>15</sup> Sin embargo, en el presente estudio no se determinó la concentración de IgG, se hizo por medio de proteínas plasmáticas. La concentración de 1000 mg/dL de IgG, entre 24 y 48 horas de edad en las becerras, a

la misma edad que se tomaron las muestras en este trabajo, se ha considerado como adecuada en becerras con buena inmunidad pasiva.<sup>16</sup> Por lo tanto, con base en lo anterior, se podría suponer que los animales del presente estudio adquirieron transferencia apropiada de IgG.

Una evidencia adicional del adecuado manejo del calostro para transferir inmunidad pasiva en este trabajo se demuestra por los resultados obtenidos en el grupo de becerras que murieron sin alteraciones detectadas. Estos animales presentaron 23.5 de hematocrito, valor significativamente menor que sus compañeras, lo cual indica mayor deshidratación, pero con 6.7 g/dL de proteínas plasmáticas. Según los estudios realizados por Tyler *et al.*,<sup>13</sup> las becerras deshidratadas necesitan como mínimo 5.5 g/dL para mostrar adecuada inmunidad pasiva, y los animales del grupo citado presentaron una concentración superior a este valor.

La inmunidad pasiva adecuada se obtuvo en los animales de este trabajo pese a la ausencia en la clasificación del calostro antes de su administración a los recién nacidos. El calostro se obtuvo de las madres y se les ofreció 2 litros entre 2 y 3 horas de edad de las becerras, la dosis se repitió a 12 horas después; a la edad con mayor capacidad para absorber inmunoglobulinas.<sup>17-21</sup> Estos resultados demuestran indirectamente que las vacas produjeron adecuada calidad de calostro.

A juzgar por los elementos anteriormente citados, el proceso de transferencia en la inmunidad pasiva se realizó en forma adecuada en los animales pertenecientes a los establos estudiados. Las vacas produjeron adecuada calidad de calostro y el calostro se obtuvo en el momento que presenta mayor concentración de inmunoglobulinas. Además, se ofreció a edad adecuada de las becerras para asegurar la absorción apropiada de inmunoglobulinas, lo que se demostró por medio de la concentración de proteínas plasmáticas.

Pese a la concentración adecuada de proteínas plasmáticas en los animales del presente trabajo, el 25.4% enfermó y el 19.4% murió. La morbilidad y mortalidad también se han utilizado como indicadores en la eficiencia de la inmunidad pasiva, se ha considerado exitosa en los casos de incidencias inferiores a 25% de morbilidad y 5% de mortalidad; porcentajes inferiores a los obtenidos en el presente trabajo. Por lo tanto, bajo este rubro, la transferencia de inmunidad no se debería considerar adecuada en los animales de este trabajo. Sin embargo, las incidencias de

mortalidad y morbilidad se han establecido en animales durante todo el año, y el presente trabajo sólo se llevó a cabo en la estación de invierno, donde se podría incrementar el porcentaje de mortalidad. En efecto, Godden *et al.*<sup>22</sup> encontraron 11.6% de mortalidad general en becerras alimentadas con sustituto lácteo. El porcentaje se incrementó a 21% en las hembras desarrolladas durante el invierno, en la misma estación del año (invierno) y la forma de alimentación (sustituto lácteo) de las becerras del presente trabajo. El elevado porcentaje de mortalidad en animales alimentados con sustituto lácteo probablemente se deba a la menor concentración de inmunoglobulinas, particularmente a IgG, y otros factores inmunes no específicos en este sistema alimenticio en comparación con becerras alimentadas con leche entera.<sup>23,24</sup> Además, la ganancia de peso y el peso al destete son mayores en los animales alimentados con leche entera que los mantenidos con sustituto lácteo,<sup>22</sup> y por consiguiente la mejor nutrición podría incrementar su función inmunológica, como lo han demostrado otros autores.<sup>25,26</sup>

El trabajo rutinario en los establos podría constituir otra posibilidad de la elevada incidencia de morbilidad y mortalidad de las becerras en el presente estudio. Los animales se trataron con productos tradicionalmente utilizados para diarreas y neumonías, alteraciones que incidieron en la mayoría de los animales enfermos, y el personal de los establos aplicaron estos tratamientos, pero este personal también se dedicaba a otras tareas como ordeño, inseminación artificial y alimentación de los animales, así como aseo del establo, y la administración de tratamientos la consideraban como actividad secundaria. Por lo tanto, se podría olvidar administrar los medicamentos y por consiguiente los microorganismos desarrollar resistencia a los productos utilizados.

## CONCLUSIÓN

El incremento de la concentración de proteínas plasmáticas redujo el riesgo a presentar alteraciones o enfermedades en las becerras del presente trabajo. Además, presentaron nivel superior de proteínas plasmáticas a la concentración considerada como exitosa para la transferencia de inmunidad pasiva, incluso en las becerras con menor valor de hematocrito. Por lo tanto, se considera como adecuada la transferencia

de inmunidad pasiva en los animales del presente trabajo bajo las condiciones de estabulación.

## REFERENCIAS

1. Weaver DM, Tyler JW, VanMetre DC, Hostetler DE, Barrington GM. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *J Vet Inter Med* 2000; 14: 569-577.
2. Noakes D. Development of the conceptus. In: Artur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. Edited by: Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW, eighth ed, 2001: 57-68.
3. Sasaki M, Davis CL, Larson BL. Immunoglobulin IgG1 metabolism in new born calves. *J Dairy Sci* 1983; 60: 623-626.
4. Nocek JE, Braund DG, Warner RG. Influence of neonatal colostrum administration, immunoglobulin, and continued feeding of colostrum on calf gain, health, y serum protein. *J Dairy Sci* 1984; 67: 319-333.
5. Barrington GM, Parish SM. Bovine neonatal immunology. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2001; 17: 463-476.
6. Morin DE, McCoy GC, Hurley WL. Effects of quality, quantity, and timing of colostrum feeding and addition of a dried colostrum supplement on immunoglobulin G, absorption in Holstein bull calves. *J Dairy Sci* 1997; 80: 747-753.
7. Besser TE, Gay CC, Pritchett L. Comparison of three methods of feeding colostrum to dairy calves. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 198: 419-422.
8. Kacsokovics I. Fc receptors in livestock species. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102: 351-362.
9. Fleenor WA, Stott GH. Hydromet test for stimation of immunoglobulin concentration in bovine colostrum. *Dairy Sci* 1980; 63: 973-977.
10. Mohammed HO, Shearer JK, Brenneman JS. Transfer of immunoglobulins and survival of newborn calves. *Cornell Vet* 1991; 81: 173-182.
11. Butler JE. Bovine immunoglobulins: a review. *J Dairy Sci* 1969; 52: 1895-1909.
12. Kehoe SI, Jayarao BM, Heinrichs AJ. A survey of bovine colostrum composition

- and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms. *J Dairy Sci* 2007; 90: 4108-4116.
13. Tyler JW, Parish SM, Besser TE, Van Metre DC, Barrington GM, Middleton JR. Detection of low serum immunoglobulin concentrations in clinically ill calves. *J Vet Intern Med* 1999; 13: 40-43.
  14. Tyler JW, Hancock DD, Parish SM, Rea DE, Besser TE, Sanders SG, Wilson LK. Evaluation of 3 assays for failure of positive transfer in calves. *J Vet Intern Med* 1996; 10: 304-307.
  15. Butler JE. Bovine immunoglobulins; an augmented review. *Vet Immunol Immunopathol* 1983; 4: 43-152.
  16. Gay CC. Failure of passive transfer of colostrum immunoglobulins and neonatal disease in calves: a review. *Proc Vet Infec Dis Org, 4<sup>th</sup> Int Symp on Neonatal Diarrhea*, Saskatoon SK, Canada, 1983.
  17. Stott GH, Menefee BE. Selective absorption of immunoglobulin IgM in the newborn calf. *J Dairy Sci* 1978; 61: 461-466.
  18. Stott GH, Marx DB, Menefee BE, Nightengale GT. Colostral immunoglobulin transfer in calves. II. The rate of absorption. *J Dairy Sci* 1979b; 62: 1766-1773.
  19. Larson BL, Heary HL, Devery JE. Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. *J Dairy Sci* 1980; 63: 665-671.
  20. Bush LJ, Staley TE. Absorption of colostrum immunoglobulins in newborn calves. *J Dairy Sci* 1980; 63: 672-680.
  21. Hopkins BA, Quigley JD III. Effects of method of colostrum feeding and colostrum supplementation of concentration of immunoglobulin G in the serum of neonatal calves. *J Dairy Sci* 1997; 80: 979-983.
  22. Godden SM, Fetrow JP, Feirtag JM, Green LR, Wells SJ. Economic analysis of feeding pasteurized nonsaleable milk versus conventional milk replacer to dairy calves. *J Am Vet Med Assoc* 2005; 226: 1547-1554.
  23. Reiter B. Review of nonspecific antimicrobial factors in colostrum. *Ann Rech Vet* 1978; 9: 205-224.
  24. Le Jan C. Cellular components of mammary secretions and neonatal immunity: a review. *Vet Res* 1996; 27: 403-417.
  25. Pollock JM, Rowan TG, Dixon JB, Carter SD, Spiller D, Warenius H. Alteration of cellular immune responses by nutrition and weaned in calves. *Res Vet Sci* 1993; 55: 298-305.
  26. Nonnecke BJ, Foote MR, Smith JM, Pesch BA, Elsasser TH, Van Ambergh ME. Composition and functional capacity of blood mononuclear leukocyte population from neonatal calves on standard and intensified milk replacer diets. *J Dairy Sci* 2003; 86: 3592-3604.

## ABSTRACT

**Jiménez-de la Cruz OU, de la Colina-Flores F, Escobar-Medina FJ. Evaluation of passive immunity in female calves in stabling conditions through plasma protein determination.** Passive immunity was evaluated through plasma protein determination in Holstein female calves from eight different dairy operations of the Tizayuca, Hidalgo, Mexico area. Female calves were separated from their dams at birth, and milk colostrum collection immediately after parturition. Female calves were fed with 2L of colostrum at 2 to 3 and 14 to 15 h of age using a milking bottle with nipple. Blood samples were taken from female calves at 48 to 72 h of age to determine plasma protein concentration and hematocrit. Besides, dairy operations were visited daily in order to found sick animals and establishment of treatments; as well as, dead animals with or without previous signs of sickness. An increase in plasma protein concentration reduces the risk for alterations or diseases in female calves. Mean plasma protein concentration was  $7.36 \pm 0.90$  (g/dL) in alive female calves without any sign of sickness, and  $6.71 \pm 1.19$  (g/dL) in alive but sick female calves, and  $6.70 \pm 0.73$  (g/dL) in dead female calves without previous signs of sickness and  $6.41 \pm 1.17$  (g/dL) in dead female calves with previous signs of sickness. Dead of female calves occurred within 2 to 3 weeks of age. Mean values for female calves hematocrit were  $34.73 \pm 7.47$ ,  $33.43 \pm 7.00$ ,  $23.50 \pm 7.42$  and  $33.38 \pm 4.24$  for alive without complications; alive with signs of sickness; dead without previous signs of sickness, and dead with

previous signs of sickness, respectively. Mean value of dead female calves without previous signs of sickness was statistically different from others means ( $P < 0.05$ ). It was concluded that an increase in plasma protein concentration reduce the risk for presenting diseases in female calves. Moreover, protein plasmatic levels were higher than those levels considered desirable for passive immunity transfer, even for female calves with the lowest hematocrit level. **Veterinaria Zacatecas 2010; 3: 175-182**

**Keywords: passive immunity, protein plasmatic, female calves**

## ESTUDIO RECAPITULATIVO SOBRE FRACTURAS EN PEQUEÑAS ESPECIES Y SU RESOLUCIÓN

Mirna Elizabeth Aguilar Faz, Sergio Vázquez Salinas, Francisco Javier Escobar Medina

Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Zacatecas  
E-mail: fescobar@uaz.edu.mx

### RESUMEN

El esqueleto proporciona soporte estructural al organismo y le permite movimiento y locomoción. Además, protege sus órganos vitales internos y sus estructuras; mantiene la homeostasis mineral y el balance ácido-básico; sirve como reservorio de factores de crecimiento y citocinas; además, permite la hematopoyesis. En el perro se compone de 321 huesos, todos con el riesgo de sufrir fracturas, por lo cual es importante su estudio y actualización de conocimientos. La reparación de fracturas se lleva a cabo de la misma manera como se realiza el desarrollo embriológico del hueso, participan de manera coordinada osteoblastos y osteoclastos, a través de señales moleculares. Los osteoblastos forman los huesos, producen y secretan la proteína más abundante de la matriz ósea (colágeno tipo I) y después la mineralizan; también producen fosfatasa alcalina y la mayoría de las proteínas no colágenas constitutivas de la matriz. Los osteoblastos pueden evolucionar hacia osteocitos, transformarse en osteoblastos inactivos, permanecer como células de revestimiento o sufrir apoptosis. Como osteocitos se incorporan a la matriz mineralizada en el proceso de osificación. Los osteoclastos disuelven el mineral y degradan la matriz orgánica de los huesos, durante la renovación ósea, en este proceso se elimina la matriz orgánica en múltiples sitios para sustituirse por tejido nuevo. La resorción ósea es necesaria para muchos procesos del esqueleto, particularmente durante el crecimiento óseo, resolución de fracturas y mantenimiento del nivel apropiado de calcio en la circulación sanguínea. Las señales moleculares como citocinas, miembros del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y factores angiogénicos participan en la resolución de las fracturas. Las citocinas inician la cascada de eventos para su resolución, reducen la respuesta al daño por medio del reclutamiento de otras células inflamatorias, incrementan la síntesis de la matriz extracelular y estimulan la angiogénesis. El desarrollo de vasos sanguíneos se relaciona con la remoción del cartilago, por lo cual es importante para la resolución de fracturas. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y las angiopoyetinas participan en el desarrollo de la angiogénesis; ambas funcionales durante la resolución de fracturas. Los osteoblastos expresan elevados niveles de VEGF y, por consiguiente, se involucran en la regulación primaria de angiogénesis y reparación de fracturas.

Palabras clave: Fracturas, resolución, pequeñas especies

---

Veterinaria Zacatecas 2010; 149-173

### INTRODUCCIÓN

El esqueleto es el conjunto de piezas óseas dispuestas en forma organizada para proporcionar soporte estructural al organismo, permitir movimiento y locomoción mediante la función orquestada con los músculos, proteger los órganos vitales internos y sus estructuras, mantener la homeostasis mineral y el balance ácido-básico, servir de reservorio de factores de crecimiento y citocinas, así como permitir la hematopoyesis.<sup>1,2</sup>

En el perro se compone aproximadamente de 321 huesos, con variaciones

que dependen del número de porciones óseas de la cola y la presencia del dedo vestigial,<sup>2</sup> todos con el riesgo de sufrir fracturas, por lo cual es importante su estudio y actualización de conocimientos.

Las fracturas se pueden resolver por medio de inmovilización de la parte afectada y permitir la formación del callo y posteriormente osificación por medio de señales moleculares.

La inmovilización se realiza mediante estructuras tubulares de yeso, férulas y vendajes, los cuales se aplican con base en el tipo de fractura, así como localización y características del hueso fracturado.<sup>3-5</sup>

La reparación de las fracturas se lleva a cabo de la misma manera como se realiza el desarrollo embriológico del hueso, participan de manera coordinada osteoblastos y osteoclastos,<sup>6</sup> a través de señales moleculares.<sup>1,7</sup>

Los osteoblastos forman los huesos y los osteoclastos disuelven el mineral y degradan su matriz orgánica.<sup>8</sup> La participación de estas células óseas permite la formación y remodelación del callo óseo en el lugar de la fractura y con esto regresan su funcionalidad al hueso.

Entre las citocinas involucradas en la resolución de las fracturas se encuentran las interleucinas-1 y -6 (IL-1 e IL-6), así como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )<sup>9,10</sup>

En el presente trabajo se revisó y analizó la información correspondiente a las características del sistema óseo, osteoblastos y osteoclastos, así como la resolución de fracturas.

Recolectar, revisar y analizar la información correspondiente a las características del sistema óseo, osteoblastos y osteoclastos para comprender la resolución de las fracturas en pequeñas especies.

## CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA ÓSEO

El esqueleto es el almacén de consistencia dura encargado de soportar y proteger los tejidos blandos en los animales. Se puede dividir en axial, apendicular y esplácnico. El axial comprende la columna vertebral, costillas, esternón y huesos de la cabeza; el apendicular los huesos de los miembros; y esplácnico o visceral, las estructuras óseas que se desarrollan en el parénquima de algunas vísceras u órganos blandos, el *os penis* del perro y el *os cardis* de buey y la oveja son algunos ejemplos.<sup>2</sup>

El hueso se puede considerar como tejido y órgano. Como lo primero, como una variedad de tejido conjuntivo rígido, donde se insertan músculos, determina la forma de las partes blandas y protege órganos vitales. Como órgano se compone por diversos tejidos (vasos, grasa, tejido hematopoyético, tejido fibroso) cuya función principal servir de reservorio mineral (sobretudo calcio y fósforo) y garantizar la homeostasis de estos minerales bajo la influencia de distintas hormonas como calcitonina y paratormona, así como vitaminas A y D.<sup>11</sup>

El tejido óseo puede ser cortical o compacto, y trabecular o esponjoso. El cortical es duro con un rango en su densidad entre 1.6 y 2.4 g/cm<sup>3</sup> y en él se insertan los músculos.<sup>12,13</sup> El

esponjoso comprende una serie de espículas óseas llamadas trabeculas y se localiza en el interior del hueso.<sup>13</sup> En el compacto, las laminillas se disponen concéntricamente alrededor de un canal vascular para formar unidades estructurales cilíndricas (sistemas haversianos u osteonas). Las laminillas del trabecular forman trabéculas (retículo tridimensional de espículas óseas ramificadas), las cuales constituyen el límite de un sistema con espacios intercomunicados donde se aloja la médula ósea.<sup>11,14</sup>

Los huesos pueden ser largos, cortos, planos y sesamoideos o irregulares (como el coxal), todos con riesgo de sufrir fracturas. Los largos se encuentran en los miembros donde actúan como columnas de soporte y palanca.<sup>2</sup> Además, constan de diáfisis, metáfisis y epífisis. La diáfisis es un cilindro óseo compacto con excavación en la parte central donde se aloja la médula ósea y vasos centromedulares.<sup>11</sup> La médula en los perros corresponde aproximadamente al 2% de su peso adulto.<sup>14</sup> Metáfisis es la zona de transición entre diáfisis y epífisis, compuesta principalmente por hueso esponjoso y una capa de tejido óseo compacto, en los animales jóvenes una placa de crecimiento la separa de la epífisis.<sup>15,16</sup> Epífisis corresponde a las extremidades y se constituye por abundante tejido esponjoso recubierto por una capa fina de tejido compacto que soporta el cartílago articular.<sup>11</sup>

Los planos forman las costillas, escápula, ilion, la mayoría de los huesos del cráneo y pelvis. Se constituyen por dos láminas de hueso compacto, separadas por una fina capa de tejido óseo esponjoso.<sup>11</sup> Reciben inserciones musculares y protegen los órganos que recubren.<sup>2</sup>

Los huesos cortos forman el carpo y el tarso, se constituyen por tejido esponjoso delimitado por una capa cortical fina de tejido compacto<sup>11</sup> y su principal función es amortiguar choques.<sup>2</sup>

El tejido óseo se compone de 4 tipos celulares (células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos), matriz orgánica, parte mineral y osteonas (laminillas de tejido mineralizado).

Las células osteoprogenitoras (células mesenquimales embrionarias) originan el tejido óseo en la vida embrionaria, pero persisten hasta la vida posnatal y participan en la reparación de fracturas y otras lesiones óseas. Estas células originan los osteoblastos.<sup>17</sup>

Los osteoblastos constituyen las células principales involucradas en la formación del

hueso, sintetizan la mayoría de las proteínas extracelulares de la matriz ósea<sup>18-21</sup> y regulan la mineralización.<sup>22-25</sup> El proceso de cristalización de calcio y fósforo (mineralización) se realiza por medio de la formación de pequeñas vesículas con fosfatasa alcalina en su interior, la cual fracciona el pirofosfato inorgánico (potente inhibidor de la mineralización) y libera fosfato.<sup>24</sup> Los osteoblastos tienen permanencia limitada, su vida media es de 1 a 10 semanas; su destino se define por medio de apoptosis,<sup>26</sup> también pueden transformarse en células de revestimiento y osteocitos.<sup>27,28</sup>

Los osteocitos son las principales y más abundantes células del hueso, participan en el remodelado óseo, así como en la maduración y remodelación de la matriz.<sup>29</sup> Su cuerpo celular se localiza en lagunas osteoplasmáticas de la sustancia intersticial calcificada. Emiten prolongaciones que transitan por los conductos calcóforos y se comunican con otros osteocitos, así como con osteoblastos y células de revestimiento.<sup>30-32</sup> Lo cual les permite responder a estímulos hormonales pese a localizarse en la parte profunda de la matriz calcificada del hueso.<sup>29,33</sup> También responden a estímulos mecánicos y se consideran las células sensoriales más importantes del hueso.<sup>29,34</sup>

Los osteoclastos proceden de las células madre hematopoyéticas medulares (Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos, CFU-GM)<sup>35</sup> y se encargan de la reabsorción ósea<sup>8</sup> durante el proceso de renovación del hueso en donde se elimina la matriz ósea en múltiples sitios y se substituye por tejido nuevo.<sup>36</sup> La reabsorción ósea es necesaria para muchos procesos del esqueleto, particularmente durante el crecimiento óseo y resolución de fracturas; también es necesaria para el mantenimiento del nivel apropiado de calcio en la circulación sanguínea.

Los osteoblastos secretan el factor estimulante de las colonias de macrófagos para promover la función de los osteoclastos. La resorción se realiza por medio del borde en forma de cepillo en los osteoclastos.<sup>36-38</sup>

La Matriz Orgánica (sustancia osteoide) se compone principalmente de colágeno y otras proteínas como proteoglicanos, proteínas con ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico, glicoproteínas (fosfatasas alcalinas, osteopontina, osteonectina y sialoproteína ósea, entre otras), proteínas del plasma y factores de crecimiento; constituye el molde para la sedimentación de los cristales de

fosfato cálcico que se encuentran en el medio extracelular en solución sobresaturada. En la síntesis ósea el fosfato cálcico se deposita sobre la malla de colágeno de la matriz orgánica que sirve de molde.<sup>39-41</sup>

La parte mineral se compone de calcio, fósforo y carbonato, en una proporción de 10:6:1. Éstos forman pequeños cristales hexagonales compuestos principalmente de hidroxiapatita y con menor contenido de burshita, magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor. Los cristales de hidroxiapatita se colocan en la disposición de la malla formada por las moléculas de colágeno en la matriz orgánica; se fijan por la acción de glicoproteínas producidas en los osteoblastos y contenidas en la matriz orgánica como: fosfatasas alcalinas, osteopontina, osteonectina y sialoproteína ósea. Estas proteínas presentan capacidad adhesiva y se encargan de favorecer la mineralización. El colágeno de la matriz orgánica no tiene afinidad por el calcio, estas proteínas son las encargadas del depósito mineral. Por otro lado, la matriz orgánica, como se anotó anteriormente, también contiene proteoglicanos y pirofosfato, proteínas inhibidoras de la mineralización. Los proteoglicanos forman espacios ausentes de sustancia osteoide e impiden el depósito del mineral,<sup>42</sup> y las moléculas de pirofosfato se unen a la superficie de los fosfatos de calcio para dificultar la formación y crecimiento de los cristales de hidroxiapatita.<sup>43</sup>

El proceso de mineralización se compone de dos partes, la primera (65%) depende de los osteoblastos y la segunda es acelular, se presenta el crecimiento de los cristales y se realiza durante algunos meses.<sup>44</sup>

El tejido óseo en general se recubre por el periostio en la parte externa y endostio en la interna. El periostio es una capa de tejido conjuntivo muy vascularizada, fibrosa y resistente, constituida por dos láminas, la interna de éstas con potencial osteógeno y la externa rica en fibras colágenas.<sup>45-47</sup> El periostio no reviste los extremos de los huesos largos donde se insertan los tendones y se recubren por tejido articular; por lo tanto, en esta parte de los huesos no se dispone de actividad osteogénica y por consiguiente no participa en la resolución de fracturas.<sup>47,48</sup> El endostio, por su parte, es una fina capa de tejido conjuntivo con potencial osteógeno y hematopoyético; reviste la cavidad medular de las diáfisis y cavidades del hueso esponjoso.<sup>13</sup>

El esqueleto experimenta dos procesos principales: modelación y remodelación.<sup>49</sup> La

modelación se realiza durante su desarrollo y crecimiento, remueve componentes óseos de un lugar y los deposita en otro diferente, para esculpir los huesos y alcancen su forma y tamaño final.<sup>49</sup>

La remodelación regenera constantemente el tejido óseo, mediante el reemplazo de hueso añejo por nuevo en el mismo lugar, y se realiza después de haber alcanzado su forma y tamaño adulto.<sup>50</sup> La remodelación se realiza por el equilibrio de actividades de las células óseas encargadas para ello, los osteoclastos realizan la resorción ósea y los osteoblastos depositan tejido nuevo.<sup>31,51,52</sup> Estos dos tipos de células forman la unidad básica multicelular (BMU); estructura temporal con osteoclastos en el frente y osteoblastos en la parte posterior.<sup>53</sup>

El proceso de remodelación se inicia con la fase activa de resorción, que se realiza de la manera siguiente: se reclutan precursores mononucleares de osteoclastos de la circulación sanguínea, posteriormente se infiltran células de revestimiento óseas y se fusionan los precursores de osteoclastos con pre-osteoclastos multinucleares.<sup>54</sup> Los pre-osteoclastos se unen a la matriz ósea por medio de podosomas, estructuras especializadas en adhesión para formar la zona de sellado.<sup>55</sup> Durante la fase de resorción, se activan los pre-osteoclastos y se transforman en osteoclastos activos y funcionales para iniciar la resorción, la cual finaliza con apoptosis de estas células,<sup>56</sup> y se continúa con la fase de formación ósea donde las lagunas de resorción liberan señales apropiadas para reclutar células osteoprogenitoras hacia su superficie y estimular la diferenciación de las células osteoprogenitoras en osteoblastos funcionales, los que mineralizan la matriz para formar hueso nuevo y rellenar las lagunas de resorción.<sup>57</sup>

## OSTEOBLASTOS

Los osteoblastos son células mononucleares, con citoplasma granular basófilo; el aspecto granular se debe al elevado número de ribosomas asociados al ARNm. Además, contienen prominente aparato de Golgi y retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado; extienden proyecciones celulares hacia el osteoide y carecen de capacidad para dividirse.<sup>58</sup>

Los osteoblastos forman los huesos y se derivan de las células mesenquimales indiferenciadas; el mismo origen de los condrocitos, miocitos y adipocitos.<sup>59-66</sup> Las

proteínas morfogenéticas óseas (BMP's), particularmente BMP-2 y BMP-4, participan en la diferenciación de las células mesenquimales, así como en su transcripción génica, para transformarlas inicialmente en preosteoblastos y después en osteoblastos.<sup>67-73</sup> Los osteoblastos pueden evolucionar hacia osteocitos, de esa manera se incorporan a la matriz mineralizada en el proceso de osificación,<sup>74</sup> también pueden transformarse en osteoblastos inactivos o permanecer como células de revestimiento, y finalmente sufrir apoptosis.<sup>75</sup>

Los osteoblastos producen y secretan la proteína más abundante de la matriz ósea (colágeno tipo I) y después la mineralizan;<sup>76</sup> también producen fosfatasa alcalina<sup>77</sup> y la mayoría de las proteínas no colágenas constitutivas de la matriz.<sup>78,79</sup> Conforme los osteoblastos se transforman en osteocitos, reducen su tamaño progresivamente<sup>34,58,80</sup> y disminuyen la biosíntesis de colágeno tipo I, así como las proteínas no colágenas: fosfatasa alcalina, osteocalcina y sialoproteína ósea.<sup>81,82</sup> Los osteoblastos, además, regulan la formación de cristales de hidroxapatita en el osteoide.<sup>83,84</sup>

Con base en lo anterior, las células formadoras del hueso pueden ser preosteoblastos, osteoblastos y osteocitos.<sup>68,74</sup> En todos los estadios se comunican a través de procesos celulares dendríticos que penetran en la matriz ósea y se conectan mediante uniones Gap.<sup>29,85-89</sup> Los osteocitos representan la diferenciación final de las células involucradas en la deposición ósea,<sup>80</sup> constituyen el componente celular más abundante en los huesos de mamíferos<sup>90</sup> y proporcionan tensión a la estructura ósea.<sup>34,80,91</sup> Esta información se presenta en la Figura 1.

La osificación es un proceso continuo, pero puede dividirse en dos etapas: la primera comprende la condensación celular e inicio de la síntesis de colágeno tipos I, II y III.<sup>92</sup> El colágeno tipo III puede formar el armazón inicial para la deposición ósea.<sup>93</sup> En la segunda, la secreción de la matriz se realiza únicamente por un lado de las células, es decir de manera polarizada, hasta involucrarse con su propia producción,<sup>94</sup> de esta manera se integran a la matriz ósea.<sup>95</sup> Por ejemplo, en la osificación endocondral, se calcifica inicialmente la matriz del cartílago, posteriormente se hipertrofian los condrocitos, los cuales se diferencian en osteoblastos o sufren apoptosis, se presenta resorción del cartílago calcificado, reclutamiento de osteoblastos y deposición de tejido óseo entrelazado

(posteriormente hueso laminado) en la superficie de los residuos del cartílago mineralizado. El complejo de fibras colágenas alineadas con proteínas no colágenas forman el hueso laminar.<sup>96-102</sup>

La mineralización del colágeno tipo I se puede realizar por eliminación de inhibidores de la nucleación (como pirofosfato) y aportando fosfato inorgánico para la mineralización. Estas funciones las llevan a cabo las fosfohidrolasas como fosfatasa alcalina, la cual desdobla fosfatos orgánicos para transformarlos en inorgánicos en los lugares iniciales de la mineralización. La matriz extracelular secreta fosfohidrolasas en el interior de vesículas, las cuales fracciona el pirofosfato inorgánico (potente inhibidor de la mineralización) y liberan fosfato.<sup>23</sup> La mineralización de la matriz extracelular se ha observado en cultivos de células óseas con la presencia de  $\beta$ -glicerolfosfato, un sustituto de fosfato orgánico.<sup>103,104</sup>

Las proteínas no colágenas pueden ser de 4 tipos: adhesión celular, proteoglicanos,  $\gamma$ -carboxiladas y factores de crecimiento. Las células óseas sintetizan cuatro de adhesión celular: fibronectina,<sup>105</sup> trombospodina,<sup>106</sup> osteopontina<sup>107,108</sup> y sialoproteína ósea.<sup>109,110</sup> Los proteoglicanos son moléculas de polisacáridos ácidos (glicosaminoglicanos) adheridas a una proteína nuclear central, en el hueso se encuentran dos tipos: condroitín sulfato (la forma predominante) y heparín sulfato. El tejido óseo cuenta con dos proteínas  $\gamma$ -carboxiladas no colágenas con residuos glutamyl dicarboxílicos (gla): osteocalcina (bone gla-protein) y MGP (matrix-gla-protein).<sup>111-113</sup> La osteocalcina constituye la principal proteína no colágena de la matriz ósea y la 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamina D<sub>3</sub> estimula su síntesis.<sup>114,115</sup> Los osteoblastos también secretan TGF- $\beta$  y los parecidos a la insulina, los cuales estimulan el crecimiento de los osteoblastos de manera autocrina y paracrina.<sup>116,117</sup>

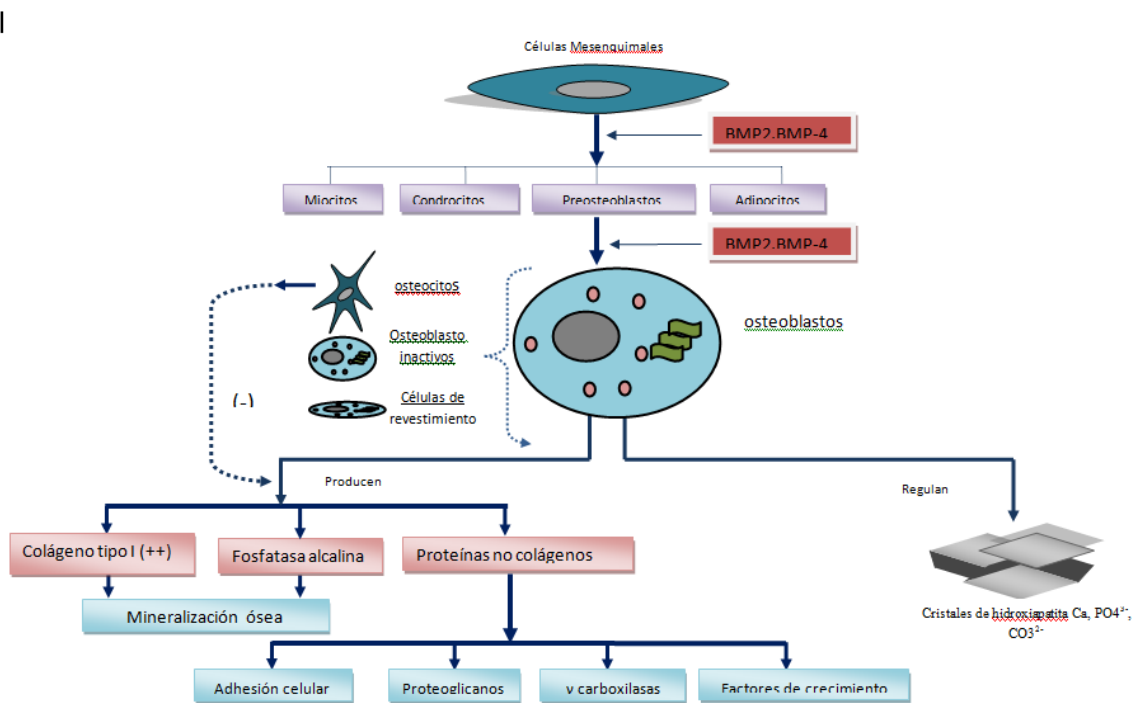


Figura 1. Características de los osteoblastos

Los cristales de hidroxiapatita son el componente principal del tejido óseo, constituidos por iones de calcio, fosfato y carbonato;<sup>118</sup> minerales muy pequeños que le permiten mantener al hueso su homeostasis iónica y función biomecánica.<sup>119</sup>

La fosfatasa alcalina se ha relacionado con la mineralización ósea, mineralización de la matriz en los estadios iniciales de la formación ósea y regularización de la proliferación celular; así como en el transporte de fosfato.<sup>120,121</sup>

Los osteoblastos sintetizan receptores en la membrana basal para hormona paratiroidea,<sup>122</sup> en citoplasma para andrógenos<sup>123</sup> y glucocorticoides,<sup>124</sup> en el núcleo para estrógenos<sup>125</sup> y 1,25 dihidroxivitamina D<sub>3</sub>.<sup>126,127</sup>

## OSTEOCLASTOS

Los osteoclastos son células de gran tamaño, multinucleares<sup>128-130</sup> citoplasma acidófilo con abundantes complejos de Golgi y mitocondrias de diferente forma.<sup>131,132</sup> Además, presentan un borde ribeteado en cepillo y zonas claras.<sup>133</sup> El borde ribeteado es una estructura compleja con invaginaciones de la membrana plasmática en forma de dedos, adyacentes a la superficie ósea. La zona clara rodea el borde ribeteado y no contiene organelos celulares, únicamente filamentos de actina. Los osteoclastos utilizan la zona clara para adherirse a la superficie ósea y separar dos áreas: resorción y ausencia de resorción; también la utilizan para mantener un microambiente favorable para su función, la resorción ósea.<sup>133</sup>

Los osteoclastos, como se puede apreciar en la Figura 2, se originan de las células madre o troncales del mesodermo, donde se derivan las células troncales hematopoyéticas, y éstas a su vez originan las células madre mieloides; de aquí surgen los osteoclastos, entre otras células como megacariocitos, granulocitos y monocitos/macrófagos.<sup>134</sup> El factor de crecimiento unidad formadora de colonia granulocito-monocito (CFU-GM) estimula las células troncales para comprometerlas en linaje común hacia macrófagos y osteoclastos, y bajo la influencia del factor estimulante de colonias macrófago-1 (CSF-1) se dirige al linaje de osteoclastos, donde surgirán los preosteoclastos.<sup>35</sup> Los preosteoclastos maduran bajo la estimulación continua del factor estimulante de colonia macrófagos (M-CSF) y la presencia del ligando de

unión al receptor activador del factor nuclear Kappa-β (RANKL).<sup>54,135,136</sup>

Los osteoclastos se pueden diferenciar a partir de células de la médula ósea por medio del factor para la diferenciación de osteoclastos (ODF);<sup>137-140</sup> también conocido como ligando de osteoprotegerina (OPGL), citoquina de inducción-activación afín al factor necrótico tumoral (TRANCE) y RANKL.<sup>141,142</sup>

Los osteoblastos se relacionan con el desarrollo de los osteoclastos,<sup>143,144</sup> el ODF se expresa en los osteoblastos y en la médula ósea<sup>51,140</sup> por acción de 1,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> [1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>], paratormona (PTH), péptidos afines a PTH (PTHrP) y citoquinas activadoras gp130 (como IL-6, IL-11) e IL-1.<sup>136</sup> PTH, PTHrP y 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> estimulan la producción de IL-6 e IL-11 en las células estroma/osteoblásticas,<sup>146-148</sup> y las citoquinas estimulan la osteoclastogénesis y promueven la resorción ósea.<sup>149-151</sup> El proceso en forma sucinta es como sigue: los osteoblastos producen RANKL, ligando que reconoce a RANK presente en los progenitores de los osteoclastos y en los osteoclastos, por medio de un mecanismo de interacción célula-célula. Esta interacción en conjunto con M-CSF completa la osteoclastogénesis. El M-CSF es un factor esencial para la proliferación y diferenciación de los osteoclastos, se produce en los osteoblastos. El RANKL controla el mecanismo mediante el cual los precursores de los osteoclastos se diferencian y después se activan en osteoclastos.

Por otro lado, la osteoprotegerina (OPG) proteína soluble, miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (clave en la resorción fisiológica de los osteoclastos) interfiere la interacción de RANK con RANKL y como consecuencia inhibe poderosamente la formación de osteoclastos *in vitro* así como la resorción ósea *in vivo*.<sup>152-154</sup> Con base en lo anterior, puede regular la densidad y masa ósea,<sup>51,52,140</sup> su dosificación sistemática bloquea la resorción patológica.<sup>155</sup>

El RANKL se une indistintamente a OPG y RANK, como consecuencia, la actividad biológica del RANKL (inducción y proliferación de osteoclastos) se disminuye debido a la unión con el competidor soluble OPG.<sup>156</sup>

Los osteoclastos han desarrollado la maquinaria eficiente para disolver el mineral y degradar la matriz orgánica de los huesos,<sup>8</sup> durante el proceso de renovación ósea, donde se elimina la matriz orgánica en múltiples sitios y se

substituye por tejido nuevo.<sup>36</sup> El precursor de los osteoclastos circula como macrófago mononuclear, y en este estadio se une al hueso. La resorción ósea es necesaria para muchos procesos

del esqueleto, particularmente durante el crecimiento óseo, resolución de fracturas y mantenimiento del nivel apropiado de calcio en la circulación sanguínea.

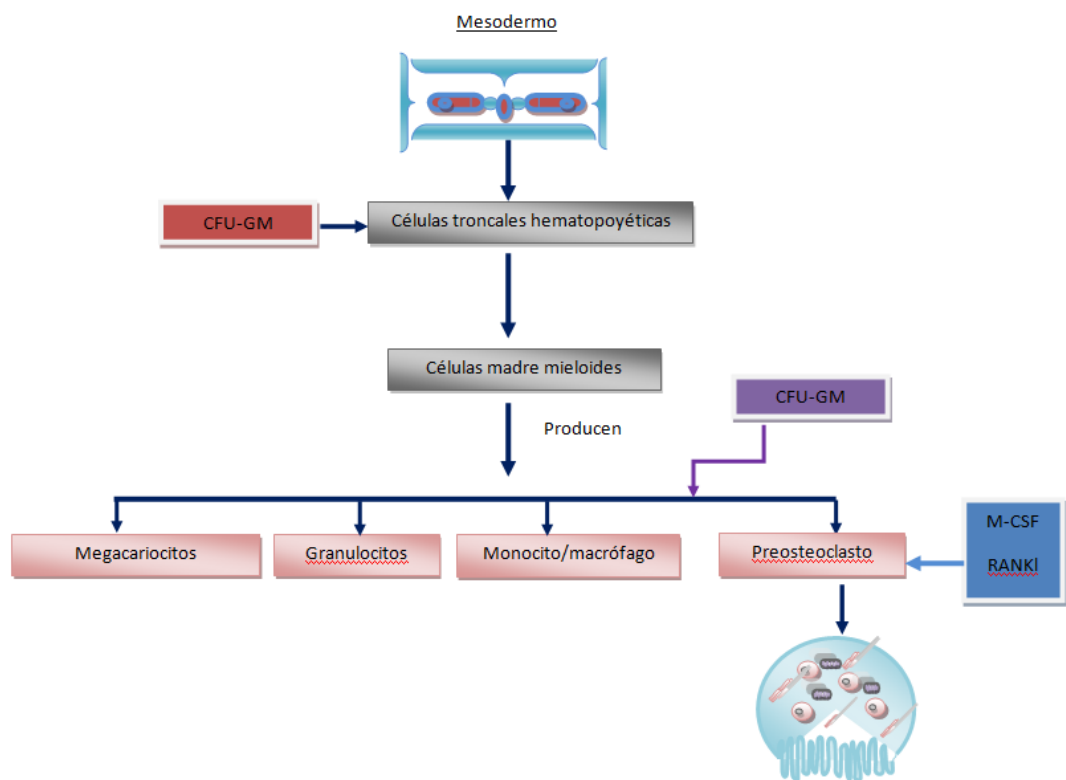


Figura 2. Origen de los osteoclastos

La resorción ósea se realiza por medio del proceso siguiente: los osteoclastos se dirigen al sitio de resorción, posteriormente se adhieren al hueso, se lleva a cabo la polarización y formación de un nuevo dominio membranar, disolución del cristal de hidroxapatita, degradación de la matriz orgánica, remoción de los productos degradados de las lagunas de resorción y finalmente apoptosis o su regreso al estado de reposo.<sup>158-160</sup>

En la migración y adhesión de los osteoclastos al lugar de resorción ósea parece participar la integrina  $\alpha_v\beta_3$ .<sup>161</sup> La membrana plasmática de los osteoclastos se adhiere a la matriz ósea limitando el sitio donde se realizará la reacción, a esta parte de la unión se le conoce como zona de sellado.<sup>160</sup>

En la parte inicial de la resorción participan integrinas, y probablemente miembros de la familia de cadherinas en todo el proceso.<sup>162</sup>

En los osteoclastos se han encontrado expresión de 4 diferentes integrinas:  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_2\beta_1$  y  $\alpha_v\beta_1$ .<sup>163</sup> La primera ( $\alpha_v\beta_3$ ) de mayor importancia,<sup>163-167</sup> algunos autores la consideran como mediadora de la unión entre matriz ósea y zona de sellado,<sup>168,169</sup> aunque no se ha encontrado su presencia en este lugar;<sup>161</sup> y pertenece a la clase de integrinas que reconocen al ácido arginina-glicina-aspartico (RGD), las cuales son parte de las proteínas de la matriz extracelular.<sup>170</sup> Los anticuerpos contra  $\beta_3$ , péptido mimético RGD y desintegrinas como echistatin, inhiben la resorción *in vivo*.<sup>171-176</sup> Además, la inhibición de integrinas por medio de anticuerpos contra  $\alpha_v\beta_3$  y péptidos miméticos RGD, impiden la resorción, así como la formación y adhesión de osteoclastos *in vitro*.<sup>177-179</sup> Los osteoclastos, además de la zona de sellado, presentan otros dominios membranales: borde

ribeteado en cepillo, dominio secretorio funcional y membrana basolateral.<sup>55,180</sup> La polarización del osteoclasto corresponde a la formación de estos dominios, se realiza como respuesta a la influencia de una citoquina relacionada con el factor de necrosis tumoral y que recibe el nombre de RANK.<sup>181-183</sup> Esta información se presenta en la Figura 3.

El borde ribeteado en cepillo se origina de la unión del osteoclasto con la matriz ósea a través de la zona de sellado, un organelo de resorción que se forma en la fusión entre vesículas ácidas intracelulares y la región de la membrana plasmática de revestimiento; la membrana se transfiere en forma de largas proyecciones al interior de la matriz ósea, con apariencia de cerdas pertenecientes a un cepillo o dedos.<sup>133,184</sup>

El dominio secretorio funcional, también llamado dominio apical, se localiza entre las dos porciones del dominio basolateral<sup>185</sup> y probablemente constituye el sitio para la exocitosis en el proceso de resorción, y transcítico de los productos degradados de la matriz.<sup>158,186</sup>

El dominio basolateral se divide en dos porciones, una a cada lado del osteoclasto y unen el borde ribeteado en cepillo y el dominio secretorio funcional.<sup>185</sup>

Los osteoclastos degradan la matriz mineralizada mediante la disolución del cristal de hidroxiapatita y división proteolítica de la matriz orgánica, la cual es rica en colágeno.

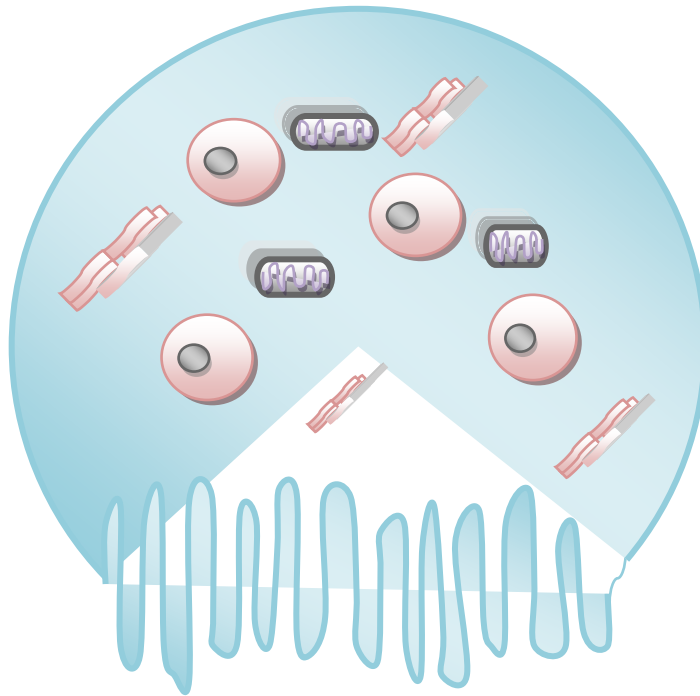


Figura 3. Características de los osteoclastos

La disolución del mineral se realiza por medio de la secreción de HCl en la laguna de resorción, a través del borde ribeteado en cepillo.<sup>133,184</sup> Las lagunas de resorción son espacios extracelulares colocados entre el borde ribeteado en cepillo y la matriz ósea, y se aíslan del fluido extracelular por la zona de sellado. Además del HCl, se presenta la disminución del pH y liberación de enzimas con actividad máxima en pH ácidos.<sup>187,188</sup> Una bomba de protones (H<sup>+</sup>)

específica y otros canales iónicos presentes en el borde ribeteado en cepillo disminuyen el pH.<sup>184</sup> Los iones de hidrógeno se generan por un complejo de ATPasa.<sup>189,190</sup> La secreción de enzimas lisosomales como fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) y catepsina K, así como metaloproteasas de la matriz (MMP) entre las que se encuentran colagenasas como la MMP-9, acompañan el proceso de acidificación del pH.<sup>191,192</sup> Después de la solubilización del mineral,

algunas enzimas proteolíticas degradan la matriz ósea orgánica. La lisosomal cistina proteinasa y la metaloproteinasas de la matriz son las principales enzimas involucradas en el proceso de resorción.<sup>193-195</sup>

Los productos degradados se alojan en un pozo de resorción denominado lagunas de Howship, se remueven a través del sendero vesicular transcitólico del borde ribeteado en cepillo, hacia el dominio secretorio funcional; posteriormente se liberan al espacio extracelular.<sup>158,186</sup> Gran parte del material degradado se transporta por medio de las células resorventes. La fosfatasa ácida tartrato resistente podría participar en la destrucción del colágeno, se ha encontrado en las vesículas transcitólicas de los osteoclastos de resorción y presenta la capacidad para generar especies de oxígeno destructivo con acción en el colágeno.<sup>196</sup> El TRAP también podría participar como destructor adicional de los productos en las vesículas transcitólicas; se ha encontrado en esta parte junto a fragmentos de colágeno.<sup>197</sup>

La resorción dura de 10 a 12 días, aproximadamente, y finaliza con apoptosis y rápida fagocitosis de los osteoclastos.<sup>56,198-200</sup> Los detalles de esta información aparecen en la Figura 4.

Los osteoclastos, además de participar en la resorción ósea, también regulan la función de osteoblastos,<sup>201,202</sup> secreción de citoquinas<sup>203</sup> (O'Keefe *et al.*, 1997) y actúan en algunas enfermedades inflamatorias del tejido óseo.<sup>204-206</sup>

## RESOLUCIÓN DE FRACTURAS

Las fracturas se pueden resolver por medio de inmovilización de la parte afectada y permitir la formación del callo y posteriormente osificación en la parte afectada por medio de señales moleculares.

### INMOVILIZACIÓN

La inmovilización para resolución de fracturas se le conoce como dispositivo de fijación por coaptación y se realiza por estructuras tubulares de yeso, férulas y vendajes. El yeso y las férulas son estabilizadores de fracturas en la diáfisis de los miembros, el yeso recubre en forma cilíndrica al miembro y las férulas sólo una superficie.<sup>4</sup>

La coaptación externa se recomienda para tratamiento de fracturas incompletas, con

mínimo desplazamiento y en animales jóvenes, éstos presentan más rápida capacidad de reparación ósea. En pacientes politraumatizados se pueden emplear férulas o vendajes como método de fijación temporal, para impedir que los fragmentos óseos provoquen daño adicional al tejido blando;<sup>5</sup> también es un buen auxiliar a otros métodos de fijación interna como artrodesis, o en fijación de fracturas de metacarpianos con clavo intramedular.<sup>3</sup>

Las férulas y vendajes deben ser confortables para el paciente, ligeros, durables, resistentes, con estabilidad deseada y favorecer la reparación ósea. Presentan mínima invasión al sitio de la fractura, se compromete al mínimo el flujo sanguíneo, se reduce el riesgo de infecciones posteriores y no interfiere con el desarrollo de animales jóvenes.

El método de coaptación externa se elige con base en factores mecánicos biológicos y clínicos. Mecánicos son los relacionados con estabilidad de la fractura e impiden el incremento del daño que podría provocar el movimiento y apoyo, así como tensiones musculares y ligamentosas.<sup>207</sup> Los biológicos influyen en el éxito de la coaptación y se debe tomar en cuenta la especie, raza edad y talla del animal. Los clínicos se relacionan con el propietario, paciente y médico veterinario, con énfasis en posibilidades de confinamiento y temperamento del paciente, disponibilidad para cooperación del propietario y experiencia del médico veterinario.

### Vendajes

Los vendajes son bandas preferentemente de tela, para colocarse de múltiples formas en diversas partes del cuerpo con la finalidad de proteger o inmovilizar la parte afectada. Se han utilizado diferentes tipos de vendajes, a continuación se describen los más importantes.

El vendaje de Robert Jones, también conocido como vendaje de traslado o de compresión se utiliza con mucha frecuencia para control del edema prequirúrgico y postquirúrgico; para reducir espacios muertos y de esta manera evitar la formación de seromas; así como para liberar tensión de suturas sobre márgenes de piel y tejidos blandos adyacentes (después de cirugías). Puede facilitar aplicaciones tópicas de medicamentos. No se recomienda en fracturas de fémur y húmero, por su tendencia a resbalarse.

Este vendaje es fácil de colocar, confortable, económico, ligero, y utiliza material

accesible y reciclable. Para su aplicación se coloca el paciente en decúbito lateral, con la extremidad afectada en la parte superior, se fija con dos estribos o tirantes de tela adhesiva y se coloca sobre una cama de algodón. No se recomienda para fracturas expuestas.<sup>3,208,209</sup> Se dispone de otras versiones del vendaje de Robert Jones, el ligero o

modificado, y el reforzado. El ligero se aplica igual pero con menor relleno de algodón y por consiguiente proporciona menos inmovilización del miembro. Se recomienda para ejercer menor compresión y se utiliza frecuentemente después de cirugías por debajo de articulaciones de rodilla y codo.<sup>210</sup>

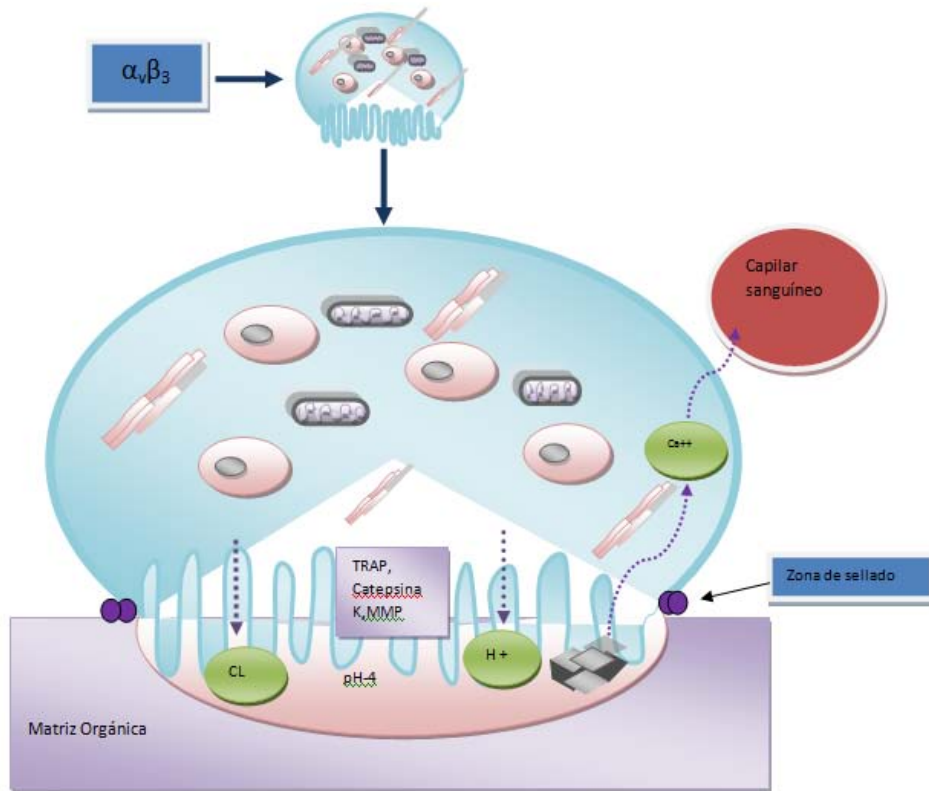


Figura 4. Proceso de resorción ósea

El reforzado se consolida con una tira de aluminio en forma de la superficie lateral o medial del vendaje, es adecuado para estabilización temporal de fracturas previas a cirugías, o para coaptación externa complementaria a reparación interna débil; requiere menor cama de algodón.<sup>210</sup>

El vendaje Ehmer se utiliza para mantener en flexión el miembro pélvico, favorece la rotación interna de la cabeza femoral mientras permanece dentro del acetábulo, permite abducción del miembro y es útil para evitar carga del peso sobre articulación coxofemoral, después de reducción cerrada en luxaciones coxofemoral

cráneo-dorsal. No es recomendable después de luxación coxofemoral ventral.

Para su aplicación, se coloca el paciente en decúbito lateral con el miembro afectado en la parte superior; se flexiona el miembro con el tarso en abducción con ligero acojinamiento de algodón o gasa alrededor del metatarso, para prevenir la fricción de la venda en esta zona.

Se cubre alrededor de la región del metatarso con venda elástica, rodeando esta región laxamente y después sobre la cara medial de la región femoral, se continúa por la parte lateral y finalmente se regresa hacia la cara medial de los metatarsos; en forma de ocho. El procedimiento se

repite varias veces, hasta lograr firmeza. Se deberá mostrar especial cuidado para no sobre-flexionar y comprometer en flujo sanguíneo del miembro.<sup>3</sup>

El vendaje Velpeau se utiliza para inmovilizar articulaciones escapulo humeral (hombro); evita el apoyo del miembro torácico y mantiene flexionadas las articulaciones del carpo, codo y hombro. Se inicia en el carpo y mano, previniendo la hiperflexión, de dirección lateral a medial. Se continúa hacia la región lateral sobre el miembro y hombro afectados, después alrededor del tórax, por detrás de la región axilar opuesta, con las articulaciones flexionadas; el vendaje finaliza en el punto de partida. Se colocan varias capas del material en forma similar sobre codo y mano para evitar su pérdida con los movimientos característicos del miembro, flexión y extensión.<sup>3,210</sup>

El cabestrillo de Robinson o ASPCA, impide carga de peso en miembros pélvicos, pero permite movimientos relativamente libres de las articulaciones. No se recomienda para estabilización primaria de lesiones, pero resulta excelente auxiliar después de reparación quirúrgica (permite movimientos de bajo impacto). Se puede utilizar para prevenir compresión sobre fracturas en consolidación de tibia y fémur, así como para pacientes con cirugía previa de rodilla y cadera.<sup>210</sup>

Para su aplicación, se dobla por el centro una cinta blanca de 2 a 2.5 m de largo por 5 cm de ancho y se presionan los lados adhesivos. Esta cinta se asegura al tarso con otra cinta de 2.5 cm. Luego se venda el vientre. La parte interna de la cinta doble se pasa medialmente a la rodilla; el vientre se asegura con cinta adhesiva.<sup>4</sup>

El vendaje de flexión carpiana impide carga de peso sobre el miembro torácico, mediante flexión del carpo, así como en huesos y articulaciones después de otros tratamientos ortopédicos. Se usa comúnmente para desviar la tensión de reparaciones del tendón (tendinorrafias o tendinoplastias) luego de laceraciones traumáticas.

Para su aplicación, se flexiona el carpo y se rodea la zona metacarpal con algodón, se coloca una venda elástica en forma anular (circular) sobre el algodón hasta rodear el radio, se fija con cinta elástica más ancha.<sup>210</sup>

### **Férulas**

Las férulas son dispositivos ortopédicos empleados para inmovilizar, limitar el movimiento o sostener una región anatómica determinada, para estabilizar fracturas o

articulaciones, en forma temporal, como estabilizador principal o auxiliar a otro método de fijación interna. Las férulas de coaptación se amoldan a la forma de la región a inmovilizar,<sup>3,211</sup> y actualmente se utilizan las férulas de Masson y Spica.

La férula de Masson se aplica en lesiones ortopédicas del miembro torácico; principalmente en fracturas de radio y ulna, carpo, metacarpo y falanges. En el miembro pélvico es útil para inmovilizar lesiones del tarso, metatarso y falanges. Se realiza con una base rígida de aluminio, plástico, tubos de PVC en forma de cucharilla ó media caña, sobre los huesos a inmovilizar.<sup>3,209</sup>

La férula de Spica se utiliza para la inmovilización temporal de hombro y cadera, previas a intervenciones quirúrgicas, en fracturas del húmero, escápula y fémur. Se puede emplear como inmovilización después de reducción en luxación lateral de articulación del hombro.<sup>3</sup>

## **SEÑALES MOLECULARES**

La reparación de fracturas se lleva a cabo de la misma manera como se realiza el desarrollo embriológico del hueso, participan de manera coordinada varios tipos celulares de la corteza, periostio, tejido blando circundante y médula ósea, mediante la combinación de las osificaciones intramembranosa y endocodal.<sup>6,212,213</sup> y a través de señales moleculares como citocinas, miembros del TGF- $\beta$  y factores anigogénicos.<sup>1,6,7,9,10</sup>

Las células mesenquimales (MSC) inician la formación y reparación ósea.<sup>10,214-217</sup> El proceso es como sigue: en el lugar de la fractura se altera la matriz y se presenta hemorragia con la subsiguiente formación de coagulo. Citocinas provenientes de la matriz y degranulación de las plaquetas atraen MSC hacia el lugar del daño. Las MSC proliferan y se diferencian en osteoblastos y condrocitos. Estas células producen matriz con formación de osteoide y cartílago para formar el callo óseo.<sup>1,218</sup> Los osteoides se mineralizan y el cartílago se osifica para formar el hueso faltante en la fractura. El callo se remodela y el tejido óseo retoma su función.<sup>6</sup> Alteraciones en cualquier parte de este proceso conduce a retardar o alterar la resolución de las fracturas.<sup>214,219-223</sup>

Entre las citocinas involucradas en la resolución de las fracturas se encuentran las interleucinas-1 y -6 (IL-1 e IL-6), así como el

TNF- $\alpha$ , particularmente RANKL y OPG. Estas citocinas inician la cascada de eventos para la resolución de fracturas, su mayor expresión se manifiesta dentro de las primeras 24 horas, después declinan rápidamente hasta niveles indetectables en el día 3.<sup>9,10</sup> Su función es reducir la respuesta al daño por medio del reclutamiento de otras células inflamatorias; además, incrementan la síntesis de la matriz extracelular y estimulan angiogénesis.<sup>10</sup> La expresión del factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF), la llave de los factores reguladores de osteoclastogénesis, también se incrementan después del daño.<sup>6</sup>

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) exhiben distintos patrones temporales de expresión en los diferentes estadios de resolución de fracturas. La expresión del mRNA de BMP-2 presenta su máximo nivel dentro 24 horas del daño, lo cual sugiere su participación como iniciadora de la cascada de eventos en la reparación de la fractura.<sup>224</sup> Durante la resolución del daño, estas proteínas se producen en las células mesenquimales, osteoblastos y condrocitos; su función: estimular la quimiotaxis, proliferación de células mesenquimales, así como diferenciación, angiogénesis y síntesis de la matriz extracelular.<sup>225,226</sup>

Se ha propuesto a las BMP-2, -6 y -9 como potentes inductores en la diferenciación de las células mesenquimales a osteoblastos, y los demás miembros de esta superfamilia como promotores de su maduración.<sup>227</sup>

El TGF- $\beta$  participa en la formación del cartílago y por consiguiente del callo óseo,<sup>228</sup> induce la expresión de las proteínas de la matriz extracelular.<sup>229</sup> Tres isoformas de este grupo (TGF- $\beta$ 1-3) se han encontrado involucradas en la reparación de fracturas; se producen por la desgranulación de plaquetas después del daño inicial, lo cual las relaciona con el inicio en la formación del callo.<sup>230</sup> Estas isoformas también se producen en osteoblastos y condrocitos, e incrementan la proliferación de células mesenquimales y preosteoblastos.<sup>231</sup> Las expresiones de TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 se incrementan el día 7 después de la fractura, cuando el colágeno tipo II aumenta su expresión, durante el período más crítico de la condrogénesis.<sup>9</sup>

Miembros de la familia del TGF- $\beta$ , como las proteínas morfogenéticas óseas (BMPx 2-8), factores de crecimiento diferenciados (GDFs 1,5,8 y 10) y TGF- $\beta$  1-3, promueven varios estados de

osificación intramembranosa y endocondral durante la resolución de fracturas.<sup>9</sup>

La expresión de TNF- $\alpha$  (RANKL y OPG) y MCSF se incrementan en asociación con la resorción del cartílago mineralizado al final de la fase endocondral.<sup>219</sup>

Durante la fase de remodelación ósea, RANKL, OPG y MCSF disminuyen su expresión en comparación con el nivel presentado durante la resorción del cartílago.<sup>6</sup>

Las BMP -3, -4, -7 y -8 se expresan del día 14 al 21 del período, durante la resorción del cartílago calcificado y mayor actividad de reclutamiento de osteoblastos, paralelamente a la formación ósea. Las BMP -5 y -6 y otros miembros de la superfamilia TGF- $\beta$ , se expresan constitutivamente durante los días 3 y 21 de la fractura, probablemente participen como reguladores de las osificaciones intramembranosa y endocondral.<sup>9</sup> Los antagonistas de BMP también participan de manera importante en la reparación de fracturas, la expresión de noggin, bloqueador de BMP-2, -4 y -7, se modula durante su resolución.<sup>232</sup> El patrón secretorio de noggin es similar al manifestado por BMP-4, lo cual sugiere al balance noggin/BMP-4 como factor importante en la formación del callo. Ausencia de noggin conduce a formación excesiva de cartílago y hueso.<sup>233</sup> La expresión de IL-1 e IL-6 se incrementa durante la parte final de la remodelación.<sup>6</sup>

El desarrollo de vasos sanguíneos se relaciona con la remoción del cartílago, por lo cual es importante para la resolución de fracturas. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)<sup>234</sup> y las angiopoyetinas<sup>235</sup> participan en el desarrollo de angiogénesis; ambas funcionales durante la resolución de fracturas.<sup>6,212,214,215</sup> Los osteoblastos expresan elevados niveles de VEGF y, por consiguiente, se involucran en la regulación primaria de angiogénesis y en reparación de fracturas.<sup>236</sup> Además, las BMPs estimulan la expresión de VEGF y sus receptores.<sup>236,237</sup>

Otro elemento involucrado en angiogénesis es el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF),<sup>238</sup> lo secretan los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas, las células endoteliales, células vasculares del músculo liso y macrófagos,<sup>239</sup> así como los osteoclastos.<sup>240</sup> Este factor estimula la proliferación celular, quimiotaxis, supervivencia y movilización del calcio de sus depósitos intracelulares,<sup>241</sup> se ha considerado como el factor

clave para la remodelación ósea.<sup>240</sup> El PDGF incrementa la formación de matriz mineralizada *in vitro*<sup>242</sup> y se ha sugerido como componente esencial en la resolución de fracturas;<sup>243</sup> su administración sistemática incrementa la densidad y resistencia ósea.<sup>244</sup>

### CONCLUSIÓN

Los huesos del sistema óseo del perro pueden sufrir fracturas, las cuales se resuelven mediante inmovilización de la parte afectada para permitir la función de los osteoblastos y osteoclastos a través de señales moleculares en el lugar adecuado para regresarle la funcionalidad al hueso. Los osteoblastos forman el hueso y los osteoclastos se encargan de la resorción ósea.

### REFERENCIAS

- Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 2005; 36: 1392-1404.
- Sisson S, Grossman JD. Anatomía de los animales domésticos; 5ª ed. Barcelona, España: Masson, SA, 1982.
- Santoscoy ME. Ortopedia, Neurología y Rehabilitación en Pequeñas Especies, Perros y Gatos. Manual Moderno, 2009.
- Brinker WO, Piermattei DL y Flo GL. Ortopedia y Reparación de Fracturas de pequeños animales; 4ª Edición; Mc Graw-Hill Interamericana, 2007.
- Tello LH. Trauma ortopédico. En trauma en pequeños animales; Editorial Argentina, 2007.
- Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 2003a; 88: 873-884.
- Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho AM, Gearhart B, Cooper GM, Huard J. VEGF improves, whereas sF1t1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 2017-2027.
- Zhao H, Ito Y, Chappel J, Andrews N, Ross PF, Teitelbaum SL. How do bone cells secrete proteins? *Adv Exp Med Biol* 2010; 658: 105-109.
- Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 513-520.
- Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-KappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 1004-1014.
- Chancrin JL. Anatomie e Physiologie de l'os. *Encyclopedie Veterinaire (Editions Scientifiques et Medicales Elsevier SAS, Paris, tous droit reserves), Orthopedie*, 2800, 1992.
- Bell LS, Cox G, Sealy JC. Determining isotopic life history trajectories using bone density fractionation and stable isotope measurement: a new approach. *Am J Phys Anthropol* 2001; 116: 66-79.
- Martin RB. Skeletal biology. In: Martin RB, Burr DB, Sharkey NA, editors. *Skeletal tissue mechanics*. New York: Springer, 1998: 29-59.
- Travlos GS. Normal structure, function and histology of bone marrow. *Toxicol Pathol* 2006; 34: 548-565.
- Brighton CT. The growth plate. *Orthop Clin North Am* 1984; 15: 571-595.
- Brighton CT. Morphology and biochemistry of the growth plate. *Rheum Dis Clin North Am* 1987; 13: 75-100.
- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996; 382: 448-452.
- Francis-West P, Tickle C. Limb development. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 212: 239-259.
- Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16: 191-220.
- Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarkzuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in developing skeleton. In *J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 46-62.

21. Deng ZL, Sharff KA, Tang N, Song WX, Luo J, Luo X, Chen J, Bennett E, Reid R, Manning D, Xue A, Montag AG, Luu HH, Haydon RC, He TC. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Front Biosci* 2008; 13: 2001-2021.
22. Posner AS, Beebe RA. The surface chemistry of bone mineral and related calcium phosphates. *Semin Arthritis Rheum* 1975; 4: 267-291.
23. Posner AS. The chemistry of bone mineral. *Bull Hosp Joint Dis* 1978; 39: 126-144.
24. Posner AS. The mineral of bone. *Clin Orthop* 1985; 200: 87-89.
25. Rey C, Kim HM, Gerstenfeld L, Glimcher MJ. Characterization of the apatite crystals of bone and their maturation in osteoblast cell culture: comparison with native bone crystals. *Connect Tissue Res* 1996; 35: 343-349.
26. Bran GM, Stern-Straeter J, Hörmann K, Riedel F, Goessler UR. Apoptosis in bone for tissue engineering. *Arch Med Res* 2008; 39: 467-482.
27. Palumbo C, Ferretti M, Marotti G. Osteocyte dendrogenesis in static and dynamic bone formation: an ultrastructural study. *Anat Rec Part A* 2004; 278A: 474-480.
28. Nijweide PJ, van der Plas A, Scherft JP. Biochemical and histological studies on various cell bone preparation. *Calcif Tissue Int* 1981; 33: 529-540.
29. Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int* 1993; 53 (Suppl 1): S102-S107.
30. Matsuo K. Cross-Talk among bone cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009; 18:292-297.
31. Henriksen K, Neutzsky-Wulff AV, Bonewald LF, Karsdal MA. Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone* 2009; 44: 1026-1033.
32. Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 1995; 17: 77S-83S.
33. Polig E, Jee WS. A model of osteon closure in cortical bone. *Calcif Tissue Int* 1990; 47: 261-269.
34. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 1994; 55: 287-299.
35. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine Rev* 1992; 13: 66-80.
36. Mundy GR. Inflammatory mediators and destruction of bone. *J Periodont Res* 1991; 26: 213-217.
37. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W Campbell P, Sanders S, Van G, Trapley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309-319.
38. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 638-649.
39. Shönau E, Rauch F. Markers of bone and collagen metabolism. Problems and perspectives in pediatrics. *Horm Res* 1997; 48 (Suppl 5): 50-59.
40. Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG. Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest* 1995; 95: 881-887
41. Canalis E, McCarthy TL, Centella M. The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989; 18: 903-918.
42. Dziewiatkowski DD, Majznerski LL. Role of proteoglycans in endochondral ossification: inhibition of calcification. *Calif Tissue Int* 1985; 37: 560-565.
43. Blumenthal NC. Mechanisms of inhibition of calcification. *Clin Orthop* 1989; 13: 279-289.
44. Roberts E. Bone Tissue Interface. *J Dental Educat* 1988; 52: 804-809.
45. Allen MR, Hock JM, Burr DB. Periostium: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone* 2004; 35: 1003-1012.
46. Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM. An interspecies comparison of bone fracture

- properties. *Biomed Mater Eng* 1998; 8: 1-9.
47. Squier CA, Ghoneim S, Kremenak CR. Ultrastructure of the periostium from membrane bone. *J Anat* 1990; 171: 233-239.
  48. Augustin G, Antabak A, Davila S. The periostium. Part 1: Anatomy, histology and molecular biology. *Injury* 2007; 1115-1130.
  49. Seeman E. Bone modeling and remodeling. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2009; 19: 219-233.
  50. Bloebaum RD, Ota DT, Skedros JG, Mantas JP. Comparison of human and canine external femoral morphologies in the context of total hip replacement. *J Biomed Mater Res* 1993; 27: 1149-1159.
  51. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93: 165-176.
  52. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (POG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*. *Endocrinology* 1998b; 139: 1329-1337.
  53. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 1994; 55: 273-286.
  54. Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 1999; 27: 1229-1241.
  55. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 793-805.
  56. Reddy SV. Regulatory mechanism operative in osteoclasts. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2004; 14: 255-270.
  57. Baron R, Vignery A, Tran Van P. The significance of lacunar erosion without osteoclasts: studies on the reversal phase of the remodeling sequence. *Metab Bone Dis Rel Res* 1980; 2S: 35-40.
  58. Palumbo C. A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chicken embryos. *Cell Tissue Res* 1986; 246: 125-131.
  59. Nörth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 2002; 20: 1060-1069.
  60. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
  61. Aubin JE. Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl.* 1998; 30-31: 73-82.
  62. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9: 641-650.
  63. Wlodarski KH. Properties and origin of osteoblasts. *Clin Orthop Relat Res* 1990; 252: 276-293.
  64. Beresford JN. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop Relat Res* 1989; 240: 270-280.
  65. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci* 1988; 10 (Suppl): 63-76.
  66. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hematopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. *Transplantation* 1974; 17: 331-340.
  67. Yamaguchi A, Kumori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocrinol Rev* 2000; 21: 393-411.
  68. Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, Lecka-Czernik B, Economides AN, Stahl N, Jilka RL, Manolagas SC. Essential requirement of BMPs 2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult

- mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 663-673.
69. Miyama K, Yamada G, Yamamoto TS, Takagi C, Miyado K, Sakai M, Ueno N, Shibuya H. A BMP-inducible gene, *dlx5*, regulates osteoblast differentiation and mesoderm induction. *Dev Biol* 1999; 208: 123-133.
  70. Gao YH, Shinki T, Yuasa T, Kataoka-Enomoto H, Komori T, Suda T, Yamaguchi A, Potential role of *Cbfa1*, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of *osteoclast differentiation factor (ODF)*. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252: 697-702.
  71. Newberry EP, Latifi T, Towler DA. Reciprocal regulation of osteocalcin transcription by the homeodomain proteins *Msx2* and *Dlx5*. *Biochemistry* 1998; 37: 16360-16368.
  72. Ryoo HM, Hoffmann HM, Beumer T, Frenkel B, Towler DA, Stein GS, Stein JL, Van Wijnen AJ, Lian JB. Stage-specific expression of *Dlx-5* during osteoblast differentiation: involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 1681-1684.
  73. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997; 89: 755-764.
  74. Scott-Savage P, Hall BK. Differentiative ability of the tibial periosteum from the embryonic chicken. *Acta Anat* 1980; 106: 129-140.
  75. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *JBMR* 1998; 13: 793- 802.
  76. Delany AM, Amling M, Priemel M, Delling G, Jowe C, Baron R, Canalis E. Osteonectin-null mice develop severe osteopenia. *Bone* 1998; 23: S199.
  77. Wlodarski KH, Reddi AH. Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue Int* 1986; 39: 382-385.
  78. Mundlos S, Olsen BR. Heritable diseases of skeleton. Part II: molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis. *FASEB J* 1997; 11: 227-233.
  79. Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard Am, Robey PG. Structure, expression, and regulation of the mayor noncollagenous matrix protein of bone. *Clin Orthop* 1991; 281: 275-294.
  80. Knothe-Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *Int Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1-8.
  81. Zhu JX, Sasano Y, Takahashi I, Mizoguchi I, Kagayama M. Temporal and spatial gene expression of mayor bone extracellular matrix molecules during embryonic mandibular osteogenesis in rats. *Histochem J.* 2001; 33: 25-35.
  82. Sasano Y, Zhu JX, Kamakura S, Kusunoki S, Mizoguchi I, Kagayama M. Expression of major bone extracellular matrix proteins during embryonic osteogenesis in rat mandibles. *Anat Embryol* 2000; 202: 31-37.
  83. Boskey AL. Matrix proteins and mineralization: an overview. *Connect Tissue Res* 1996; 35: 357-363.
  84. Boskey AL. Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities. *J Cell Biochem* 1998; 30-31 (Suppl): 83-91.
  85. Hirao M, Hashimoto J, Yamasaki N, Ando W, Tsuboi H, Myoui A, Yoshikawa H. Oxygen tension is an important mediator of the transformation of osteoblast to osteocytes. *J Bone Miner Metab* 2007; 25: 266-276.
  86. Donahue HJ. Gap junctions and biophysical regulation of bone-cell differentiation. *Bone* 2000; 26: 417-422.
  87. Yellowley CE, Li Z, Zhou Z, Jacobs CR, Donahue HJ. Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 209-217.
  88. Shapiro F. Variable conformation of GAP junctions linking bone cells: a transmission electron microscopic study of linear, stacked linear, curvilinear, oval, and annular junctions. *Calcif Tissue Int* 1997; 61: 285-293.

89. Palumbo C, Palazzini S, Zaffe D, Marotti G. Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbits: an ultrastructural study of the formation of cytoplasmic processes. *Acta Anat* 1990; 137: 350-358.
90. Marotti G. The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition. *Ital J Anat Embryol* 1996; 101: 25-79.
91. Burger EH, Klein-Nulend J, Smit TH. Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodeling osteon: a proposal. *J Biomech* 2003; 36: 1453-1459.
92. Dunlop LL, Hall BK. Relationships between cellular condensation, preosteoblast formation and epithelial-mesenchymal interactions in initiation of osteogenesis. *Int J Dev Bio* 1995; 39: 357-371.
93. Carter DH, Sloan P, Aaron JE. Immunolocalization of collagen types I and III, tenascin and fibronectin in intramembranous bone. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 599-606.
94. Ferreti M, Palumbo C, Contri M, Marotti G. Static and dynamic osteogenesis: two different types of bone formation. *Anat Embryol* 2002; 206: 21-29.
95. Nefussi JR, Sautier JM, Nicolas V, Forest N. How osteoblast become osteocytes: a decreasing matrix forming process. *J Biol Buccale* 1991; 19: 75-82.
96. Eames BF, de la Fuente L, Helms JA. Molecular ontogeny of the skeleton. *Res C Embryo Today* 2003; 69: 93-101.
97. Buxton PG, Hall BK, Archer CW, Francis-West P. Secondary chondrocyte-derived *Ihh* stimulates proliferation of periosteal cells during chick development. *Development* 2003; 130: 4729-4739.
98. Palumbo C, Ferretti M, De Pol A. Apoptosis during intramembranous ossification. *J Anat* 2003; 203: 589-598.
99. Gerstenfeld LC, Shapiro FD. Expression of bone-specific genes by hypertrophic chondrocytes: implication of the complex function of the hypertrophic chondrocyte during endochondral bone development. *J Cell Biochem* 1996; 62: 1-9.
100. Thesingh CW, Groot CG, Wassenaar AM. Transdifferentiation of hypertrophic chondrocytes into osteoblast in murine fetal metatarsal bones, induced by co-cultured cerebrum. *Bone Miner Res* 1991; 12: 25-40.
101. Roach HI. Long-term organ culture of embryonic chick femora: a system for investigation bone and cartilage formation at an intermediate level of organization. *J Bone Miner Res* 1990; 5: 85-100.
102. Roach HI. Trans-differentiation of hypertrophic chondrocytes into cells capable of producing a mineralized bone matrix. *Bone Miner* 1992; 19: 1-20.
103. Beresford JN, Graves SE, Smoothy CA. Formation of mineralized nodules by bone derived cells *in vitro*: a model of bone formation? *Am J Med Genet* 1993; 45: 163-178.
104. Tenenbaum HC, Heersche JNM. Differentiation of osteoblasts and formation of mineralized bone *in vitro*. *Calcif Tissue Int* 1982; 34: 76-79.
105. Garcia AJ, Ducheyne P, Boettiger DJ. Effect of surface reaction stage of fibronectin-mediated adhesion of osteoblast-like cells to bioactive glass. *J Biomed Mater Res* 1998; 40: 48-56.
106. Gehron Robey P, Young MF, Fisher LW, McClain TD. Thrombospondin is an osteoblastic-derived component of mineralized extracellular matrix. *J Cell Biol* 1989; 108: 719-727.
107. McKee MD, Nanci A. Secretion of osteopontin by macrophages and its accumulation at tissue surfaces during wound healing in mineralized tissues: a potential requirement for macrophage adhesion and phagocytosis. *Anat Rec* 1996; 245: 394-409.
108. McKee MD, Glimcher MJ, Nanci A. High resolution immunolocalization of osteopontin and osteocalcin in bone and cartilage during endochondral ossification in the chicken tibia. *Anat Rec* 1992; 234: 479-492.
109. Somerman MJ, Fisher LW, Foster RA, Sauk JJ. Human bone sialoprotein I and II enhance fibroblast attachment *in vitro*. *Calcif Tissue Int* 1988; 43: 50-53.
110. Fisher LW, Hawkins GR, Tuross N, Termine JD. Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and

- osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J Biol Chem* 1987; 262: 9702-9708.
111. Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin JE. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 1999; 74: 616-627.
  112. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997; 64: 295-312.
  113. Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to regulation of tissue specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB* 1990; 4: 3111-3123.
  114. Beresford JN, Gallagher JA, Poser JW, Russell RGG. Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>, 24,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>, parathyroid hormone, and glucocorticoids. *Metab Bone Dis Relat Res* 1984; 5: 229-234.
  115. Price PA, Baukol SA. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> increases synthesis of the Vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 1980; 255: 11660-11663.
  116. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Isolation and characterization of insulin-like growth factor I (somatomedin-C) from cultures of fetal rat calvariae. *Endocrinology* 1988; 122: 22-27.
  117. Gehron Robey P, Yung MF, Flanders KC, Roche NS, Kondaiah P, Reddi AH, Termine JD, Sporn MB, Roberts AB. Osteoblast synthesize and respond to transforming growth factor-type β (TGF-β) *in vitro*. *J Cell Biol* 1987; 105: 457-463.
  118. Pasteris JD, Wopenka B, Valsami-Jones E. Bone and tooth mineralization: why apatite? *Elements* 2008; 4: 97-104.
  119. Eppell SJ, Tong W, Katz JL, Kuhn L, Glimcher MJ. Shape and size of isolated bone mineralites measured using atomic force microscopy. *J Orthop Res* 2001; 19: 1927-1034.
  120. Iba K, Chiba H, Sawada N, Hirota S, Ishii S, Mori M. Glucocorticoids induce mineralization coupled with bone protein expression without influence on growth of a human osteoblastic cell line. *Cell Struct Funct* 1995; 20: 319-330.
  121. Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev* 1994; 15: 439-461.
  122. Jüppner H, Abou-Samra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, Kolakowaski LF Jr, Hock J, Potts JT Jr, Kronenberg HM. A G protein linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 1991; 254: 1024-1026.
  123. Colvard DS, Eriksen EF, Keeting PE, Wilson EM, Lubahn DB, French FS, Riggs BL, Spelsberg TC. Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 854-857.
  124. Subramaniam M, Colvard D, Keeting PE, Rasmussen K, Riggs BL, Spelsberg TC. Glucocorticoid regulation of alkaline phosphatase, osteocalcin, and proto-oncogenes in normal human osteoblast-like cells. *J Cell Biochem* 1992; 50: 411-424.
  125. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988; 241: 84-86.
  126. Kream BE, Jose M, Yamada S, De Luca HF. A specific high-affinity binding macromolecule for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in fetal bone. *Science* 1977; 197: 1086-1088.
  127. McDonnell DP, Pike JW, O'Malley BW. The vitamin D receptor: a primitive steroid receptor related to thyroid hormone receptor. *J Steroid Biochem* 1988; 30: 41-46.
  128. Piper K, Boyde A, Jones SJ. The relationship between the number of nuclei of an osteoclasts and its resorptive capability in vitro. *Anat Embryol (Berl)* 1992; 186: 291-299.
  129. Ries WL, Gong JK, Gunsolly JC. The distribution and kinetics of nuclei in rat osteoclasts. *Cell Tissue Kinet* 1987; 20: 1-14.
  130. Rosenfeldt N, Fujii H, Zheng MH, Seydell U. Nucleolar organized regions (Ag-NORs) in multinuclear osteoclast. *J Bone Miner Metab* 1998; 16: 227-233.

131. Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of the osteoclast function. *J Cell Sci* 2000; 113: 377-381.
132. Suda T, Nakamura I, Jimi E, Takahashi N. Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 869-879.
133. Väänänen HK, Karhukorpi EK, Sundquist K, Wallmark B, Roininen I, Hentunen T, Tuukkanen J, Lakkakorpi P. Evidence for the presence of proton pump of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase type in the ruffled border of osteoclasts. *J Cell Biol* 1990; 11: 1305-1311.
134. Miyamoto T, Suda T. Differentiation and function of osteoclasts. *Keio J Med* 2003; 52: 1-7.
135. Li J, Sarosi I, Yan XQ, Moroni S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S, Elliot R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan SC, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1566-157.
136. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor families. *Endoc Rev* 1999; 20: 345-357.
137. Aubin JE, Bonnelye E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int* 2000; 11: 905-913.
138. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Olivera-dos-Santos A, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mac TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397: 315-323.
139. Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 1999; 401: 556-562.
140. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kiosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998a; 95: 3597-3602.
141. Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinck J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS III, Frankel WN, Lee SY, Choi Y. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 25190-25194.
142. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997; 390: 175-179.
143. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. The effects of androgen deficiency on murine bone remodeling and bone mineral density are mediated via cells of the osteoblastic lineage. *Endocrinology* 1997; 138: 4013-4021.
144. Jilka RL, Weinstein RS, Takahashi K, Parfitt AM, Manolagas SC. Linkage of decreased bone mass with impaired osteoblastogenesis in a murine model of accelerated senescence. *J Clin Invest* 1996; 97: 1732-1740.
145. Grey A, Mitnick MA, Masiuliewicz U, Sun BH, Rudikoff S, Jilka RL, Manolagas SC, Insogna K. A role of interleukin-6 in parathyroid hormone-induced bone resorption *in vivo*. *Endocrinology* 1999; 140: 4683-4690.
146. Udagawa N, Takahashi N, Katagiri T, Tamura T, Wada S, Findlay DM, Martin TJ, Hirota H, Tada T, Sishimoto T, Suda T. Interleukin (IL)-6 induction for osteoclast differentiation depends on IL-6-receptor expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J Exp Med* 1995; 182: 1461-1468.

147. Greenfield EM, Shaw SM, Gornik SA, Banks MA. Adenyl cyclase and interleukin 6 are downstream effectors of parathyroid hormone resulting in stimulation of bone resorption. *J Clin Invest* 1995; 96: 1238-1244.
148. Girasole G, Passeri G, Jilka RL, Manolagas SC. Interleukin-11: a new cytokine critical for osteoclast development. *J Clin Invest* 1994; 93: 1516-1524.
149. Taguchi Y, Yamamoto M, Yamate T, Lin SC, Mocharla H, DeTogni P, Nakayama N, Boyce BF, Abe E, Manolagas SC. Interleukin-6-type cytokines stimulate mesenchymal progenitor differentiation toward the osteoblastic lineage. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110: 559-574.
150. Bellido T, Stahl N, Farruggella TJ, Borba V, Yancopoulos GD, Manolagas SC. Detection of receptors for interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in bone marrow stromal/osteoblastic cells. *J Clin Invest* 1996; 97: 431-437.
151. Bellido T, Borba VZ, Roberson P, Manolagas SC. Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology* 1997; 138: 3666-3676.
152. Kostenuik PJ, Shalhoub V. Osteoprotegerin: a physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption. *Curr Pharm Des* 2001; 7: 13-35.
153. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 2-12.
154. Tsuda E, Goto M, Michizuki S, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234: 137-142.
155. Morony S, Capparelli C, Lee R, Shimamoto G, Boone T, Lacey DL, Dunstan CR. A chimeric form of osteoprotegerin inhibits hypercalcemia and bone resorption induced by IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , PTH, PTHrP and 1,25(OH) $_2$ D $_3$ . *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1478-1485.
156. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelly M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, Hu S, Lacey DL. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 1999; 145: 527-538.
157. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289: 1504-1508.
158. Salo J, Lehenkari P, Mulari M, Metsikkö K, Väänänen HK. Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science* 1997; 276: 270-273.
159. Nakamura I, Gailit J, Sasaki T. Osteoclast integrins  $\alpha$ v $\beta$ 3 is present in the clear zone and contributes to cellular polarization. *Cell Tissue Res* 1996; 286: 507-515.
160. Väänänen HK, Horton M. The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesions structure. *J Cell Sci* 1995; 108: 2729-2732.
161. Lakkakorpi PT, Horton MA, Helfrich MH, Karhukorpi EK, Väänänen HK. Vitronectin receptor has a role in bone resorption but does not mediate tight sealing zone attachment of osteoclasts to the bone surface. *J Cell Biol* 1991; 115: 1179-1186.
162. Ilvesaro JM, Lakkakorpi PT, Väänänen HK. Inhibition of bone resorption in vitro by peptide containing the cadherin cell adhesion recognition sequence HAV is due to prevention of sealing zone formation. *Exp Cell Res* 1998; 242: 75-83.
163. Nesbitt SA, Helfrich M, Horton M. Biochemical characterization of human osteoclast integrins. Osteoclast express  $\alpha$ v $\beta$ 3,  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 and  $\alpha$ v $\beta$ 1 integrins. *J Biol Chem* 1993; 268: 16737-16745.
164. Ross FP, Chappel J, Alvarez JJ, Sander D, Butler WT, Farach-Carson MC, Mintz KA, Robey PG, Teitelbaum SL, Cheresch DA. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin

- $\alpha_v\beta_3$  potentiate bone resorption. *J Biol Chem* 1993; 268: 9901-9907.
165. Helfrich MH, Nesbitt SA, Horton MA. Integrins on rat osteoclast: characterization of two monoclonal antibodies (F4 and F11) to rat  $\beta_3$ . *J Bone Miner Res* 1992; 7: 345-351.
  166. Horton MA, Taylor ML, Arnett TR, Helfrich MH. Agr-Gly Asp (RGD) peptides and the anti-vitronectin receptors antibody 23C6 inhibit dentine resorption and cell spreading by osteoclasts. *Exp Cell Res* 1991; 195: 368-375.
  167. Davis J, Warwick J, Totty N, Philp R, Helfrich M, Horton M. The osteoclast functional antigen, implicated in the regulation of bone resorption, is a biochemically related to the vitronectin receptor. *J Cell Biol* 1989; 109: 1817-1826.
  168. Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegard D. Osteopontin-a possible anchor of osteoclast to bone. *Proc Nat Acad Sci USA* 1990; 87: 4473-4475.
  169. Holt I, Marchall MJ. Integrin subunit  $\beta_3$  plays a crucial role in the movement of osteoclasts from the periosteum to the bone surface. *J Cell Physiol* 1998; 175: 1-9.
  170. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25.
  171. Fisher JE, Caulfield MP, Sato M, Quartuccio HA, Gould RJ, Garsky VM, Rodan GA, Rosenblatt M. Inhibition of osteoclastic bone resorption in vivo by echistatin, an 'arginyl-glycyl-aspartyl' (RGD)-containing protein. *Endocrinology* 1993; 132: 1411-1413.
  172. King KL, D'Anza JJ, Bodary S, Pitti R, Siegel M, Lazarus RA, Dennis MS, Hammonds RG Jr, Kukreja SC. Effects of kistrin on bone resorption in vitro and serum calcium in vivo. *J Miner Res* 1994; 9: 381-187.
  173. Cippes BA, Engleman VW, Settle SL, Delarco J, Orberg RL, Helfrich MH, Horton MA, Nickols GA. Antibody to  $\beta_3$  integrin inhibits osteoclast-mediated bone resorption in the thyroparathyroidectomized rat. *Endocrinology* 1996; 137: 918-924.
  174. Engleman VW, Nickols GA, Ross FP, Horton MA, Griggs DW, Settle SL, Ruminski PG, Teitelbaum SL. A peptidomimetic antagonist of the  $\alpha_v\beta_3$  integrin inhibits bone resorption *in vitro* and prevents osteoporosis *in vivo*. *J Clin Invest* 1997; 99: 2284-2292.
  175. Yamamoto M, Fisher JE, Gentile M, Seedor JG, Leu CT, Rodan SB, Rodan GA. The integrin ligand echistatin prevents bone loss in ovariectomized mice and rats. *Endocrinology* 1998; 139: 1411-1419.
  176. Masarachia P, Yamamoto M, Leu CT, Rodan G, Duong LT. Histomorphometric evidence for echistatin inhibition of bone resorption in mice with secondary hyperparathyroidism. *Endocrinology* 1998; 139: 1401-1410.
  177. Chambers TJ, Fuller K, Darby JA, Pringle JAS, Horton MA. Monoclonal antibodies against osteoclast inhibit bone resorption in vitro. *Bone Miner* 1986; 1: 127-135.
  178. Sato M, Sardana MK, Frasser WA, Garsky VM, Murray JM, Gould RJ. Echistatin is a potent inhibitor of bone resorption in culture. *J Cell Biol* 1990; 111: 1713-1723.
  179. Nakamura I, Tanaka H, Rodan GA, Duong LT. Echistatin inhibits the migration of murine perfusion osteoclasts and the formation of multinucleated osteoclast-like cells. *Endocrinology* 1998; 139: 5182-5193.
  180. Teti A, Marchisio PC, Zallone AZ. Clear zone in osteoclast function: role of podosomes in regulation of bone-resorbing activity. *Am J Physiol* 1991; 261: C1-C7.
  181. Takahashi N, Ejiri S, Yanagisawa S, Ozawa H. Regulation of osteoclast polarization. *Odontology* 2007; 95: 1-9.
  182. Armstrong AP, Tometsko ME, Glaccum M, Sutherland CL, Cosman D, Dougall WC. A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function. *J Biol Chem* 2002; 277: 44347-44356.
  183. Hsu H, Lacey DL, Dustan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliot G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliot R, Chiu L, Black T, Scully

- S, Capparelli C, Monroy S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3540-3545.
184. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 1989; 245: 855-857.
185. Simons K. Biogenesis of epithelial cells surface polarity. *Harvey Lect* 1993-1994; 89: 125-146.
186. Nesbitt SA, Horton MA. Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science* 1997; 276: 266-269.
187. Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* 1988; 175: 266-276.
188. Baron R, Neff L, Louvard D, Courtov PJ. Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *J Cell Biol* 1985; 101: 2210-2222.
189. Mattsson JP, Li X, Peng SB, Nilsson F, Anderson P, Lundberg LG, Stone DK, Keeling DJ. Properties of three isoforms of the 116-kDa subunit of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase from a single vertebrate species. Cloning, gene expression and protein characterization of functionally distinct isoforms in *Gallus gallus*. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4115-4126.
190. Lee BS, Gluck SL, Holliday LS. Interaction between vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and microfilaments during osteoclast activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 29164-29171.
191. Delaissé JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech* 2003; 61: 504-513.
192. Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, Kurdyla JT, McNulty DE, Drake FH, Gowen M, Levy MA. Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K-expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem* 1996; 271: 12517-12524.
193. Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, Lee-Rykaczewski E, Coleman L, Rieman D, Barthlow R, Hastings G, Gowen M. Cathepsin K, but not cathepsins B, L or S is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem* 1996; 271: 12511-12516.
194. Tezuka K, Nemoto K, Tezuka Y, Sato T, Ikeda Y, Kobori M, Kawashima H, Eguchi H, Hakeda Y, Kumegawa W. Identification of matrix metalloproteinase 9 in rabbit osteoclasts. *J Biol Chem* 1994; 269: 15006-15009.
195. Wucherpfenning AL, Li YP, Stetler-Stevenson WG, Rosenberg AE, Stashenko P. Expression of 92 kD type IV collagenase/gelatinase B in human osteoclasts. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 549-556.
196. Halleen JM, Räisänen S, Salo JJ, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA, Lehenkari PP, Kaija H, Vihko P, Vaänänen HK. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem* 1999; 274: 22907-22910.
197. Hayman AR, Jones SJ, Boyde A, Foster D, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Cox TM. Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development* 1996; 122: 3151-3162.
198. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- $\beta$ . *Nat Med* 1996; 2: 1132-1136.
199. Kameda T, Miiyazawa K, Mori Y, Yuasa T, Schiokawa M, Nakamaru Y, Mano H, Hakeda Y, Kameda A, Kumegawa M. Vitamin K2 inhibits osteoclastic bone resorption by inducing osteoclast apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 515-519.
200. Eriksen EF. Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three-dimensional reconstruction of

- remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease. *Endoc Rev* 1986; 7: 379-408.
201. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, Suda T, Matsuo K. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab* 2006; 4: 111-121.
  202. Lee SH, Rho J, Jeong D, Sul JY, Kim T, Kang JS, Miyamoto T, Suda T, Lee SK, Pignolo RJ, Koczon-Jarekko B, Lorenzo J, Choi Y. vATP-ase Vo subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation. *Nat Med* 2006; 12: 1403-1409.
  203. O'Keefe RJ, Teot LA, Singh D, Puzas JE, Rosier RN, Hicks DG. Osteoclast constitutively express regulators of bone resorption: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Lab Investig* 1997; 76: 457-465.
  204. Jacquin C, Gran DE, Lee SK, Lorenzo JA, Aguila HL. Identification of multiple osteoclast precursor populations in murine bone marrow. *J Bone Miner Res* 2006; 21: 67-77.
  205. Li P, Schwarz EM, O'Keefe RA, Ma L, Looney RJ, Ritchin CT, Boyce BF, Xing L. Systemic tumor necrosis factor  $\alpha$  mediates an increase in peripheral CD11bhigh osteoclast precursors in tumor necrosis factor  $\alpha$ -transgenic mice. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 265-276.
  206. Ritchlin CT, Haas-Smith SA, Li P, Hicks DG, Schwarz EM. Mechanisms of TNF $\alpha$  and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *J Clin Invest* 2003; 111: 821-831.
  207. Harasen G. External coaptation of distal radius and ulna fractures. *Can Vet J* 2003; 44:1010-1011.
  208. Marvin L. *Small Animal Orthopedics*. Mosby, 1995.
  209. Weinstein J, Ralphs SC. External Coaptation. *Clin Tech Small Anim Pract* 2004; 19:98-104.
  210. Slatter D. Coaptación externa, En *Tratado de Cirugía en Pequeños Animales*; 3ª ed; Inter-medica, 2006.
  211. Keller MA, Montavon PM. Conservative Fracture Treatment Using Casts: Indications, Principles of Closed Fracture Reduction and Stabilization, and Cast Materials. *Compendium Continuing Education for Veterinarians* 2006; 28: 631-640.
  212. Einhorn T, Lee C. Bone regeneration: new findings and potential clinical applications. *J Am Acad Orthop Surg* 2001; 9: 157-165.
  213. Ferguson C, Alpern E, Mclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 1999; 87: 57-66.
  214. Lehman W, Edgar CM, Wang K, Cho TJ, Barnes GL, Kakar S, Graves DT, Rueger JM, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing. *Bone* 2005; 36: 300-310.
  215. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, Steinmeta H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Buggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 9656-9661.
  216. Gerber HP, Ferrara N. Angiogenesis and bone growth. *Trend Cardiovasc Med* 2000; 10: 223-228.
  217. Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 1272-1281.
  218. Gerstenfeld LC, Alkhiary YM, Krall EA, Nicholls FH, Stapleton SN, Fitch JL, Bauer M, Kayal R, Graves DT, Jepsen J, Einhorn TA. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. *J Histochem Cytochem* 2006; 54: 1215-1228.
  219. Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Tsay A, Fitch J, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Impaired fracture healing in the absence of TNF- $\alpha$  in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res* 2003b; 18: 1584-1592.
  220. Colnot C, Thompson Z, Mclau T, Werb Z, Helms JA. Altered fracture repair in

- the absence of MMP9. *Development* 2003; 130: 4123-4133.
221. Aizawa T, Kon T, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Induction of apoptosis in chondrocytes by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Orthop Res* 2001; 19: 785-796.
  222. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling: ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999; 5: 623-628.
  223. Vu TH, Shipley JM, Berges G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 1998; 93: 411-422.
  224. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, Einhorn T, Tabin CJ, Rosen V. BMP-2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet* 2006; 38: 1424-1429.
  225. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A (Suppl 1): S1-S6.
  226. Sakou T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone* 1998; 22: 591-603.
  227. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Sztatkowski JP, Park JY, He TC. Osteogenic Activity of the Fourteen Types of Human Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85: 1544-1552.
  228. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1805-1815.
  229. Sandberg MM, Aro HT, Vuorio EI. Gene expression during bone repair. *Clin Orthop Relat Res* 1993; 289: 292-312.
  230. Bostrom MP. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998; 355 (Suppl): S116-S123.
  231. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. *Biology and clinical application. J Bone Joint Surg Am* 2002; 84: 1032-1044.
  232. Yoshimura Y, Nomura S, Kaeasaki S, Tsutsumimoto T, Shimizu T, Takaoka K. Colocalization of noggin and bone morphogenetic protein-4 during fracture healing. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 876-884.
  233. Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* 1998; 280: 1455-1457.
  234. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
  235. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartumkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; 87: 1171-1180.
  236. Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoopgendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE, Löwik CW. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factors A. *Endocrinology* 2002; 143: 1545-1553.
  237. Yeh LC, Lee JC. Osteogenic protein-1 increases gene expression of vascular endothelial growth factor in primary cultures of fetal rat calvaria cells. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 153: 113-124.
  238. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and *in vivo* role of platelet derived growth factor. *Physiol Rev* 1999; 79: 1283-1316.
  239. Meyer-Ingold W, Eichner W. Platelet-derived growth factor. *Cell Biol Int* 1995; 19: 389-398.
  240. Kubota K, Sakikawa C, Katsumata M, Nakamura T, Wakabayashi K. Platelet-derived growth factor BB secreted from osteoclasts acts as an osteoblastogenesis inhibitory factor. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 257-265.
  241. Diliberto PA, Gordon GW, Yu CL, Earp HS, Herman B. Platelet-derived growth factor (PDGF)  $\alpha$  receptor activation modulates the calcium mobilizing activity of the PDGF  $\beta$  receptor in

- Balb/c3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1992; 267: 11888-11897.
242. Hsieh SC, Graves DT. Pulse application of platelet-derived growth factor enhances formation of a mineralizing matrix while continuous application is inhibitory. *J Cell Biochem* 1998; 69: 169-180.
243. Fujii H, Kitazawa R, Maeda S, Mizuno K, Kitazawa S. Expression of platelet-derived growth factor proteins and their receptor  $\alpha$  and  $\beta$  mRNAs during fracture healing in the normal mouse. *Histochem Cell Biol* 1999; 112: 131-138.
244. Mitlak BH, Finkelman RD, Hill EL, Li J, Martin B, Smith T, D'Andrea M, Antoniades HN, Lynch SE. The effect of systemically administered PDGF-BB on the rodent skeleton. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 238-247.

### ABSTRACT

**Aguilar-Faz, ME, Vázquez-Salinas S, Escobar-Medina FJ. Review of fractures in small animals and its resolution.** The skeleton gives to the organism structural support and allows its movements and locomotion. In addition, it protects vital organs, keeps the mineral homeostasis and pH balance; allows the hematopoiesis and acts like reservoir of growth factors and cytokines. In the canine specie, the skeleton is composed of 321 bones, all of them under the permanent risk of being fractured. This fact then makes important the study of these bones. Any fracture reparation is conducted as equal as in embryologic bone development; where osteoclast and osteoblast cells take part in this process in a coordinated way by means of molecular signals. The osteoblast cells create the bone, produce and secrete the most abundant protein of the osseous matrix (type I collagen) and later mineralize it. They also produce alkaline fosfatase and most of the non-collagen proteins that constitute the matrix. The osteoblast may evolution to osteocytes, transform to inactive osteoblast, stay like covering cells or undergo apoptosis. Like osteocytes, they take part of the mineralized matrix in the ossification process. The osteoclast dissolve the mineral and deteriorate the bone's organic matrix during the osseous renovation. In this process the organic matrix is eliminated in many sites in order to be substituted by new tissue. Bone resorption is needed to many process of the skeleton particulary during bone growth, facture resolution and maintenance of appropriate levels of Ca in blood circulation. The molecular signals, like cytokines, transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and angiogenic factors participate in fracture's resolutions. The cytokines begging the cascade of events (for its resolution) decrease the damage response by recluting inflammatory cells, increase the extracellular matrix synthesis and simulate the angiogenesis. The development of blood vessels is related with cartilage removal; therefore it is important for fracture resolution. The vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietins take part in angiogenesis development, both active during fracture resolution. The osteoblast cells express increased levels of VEGF, and thercture, they are involved in the primary regulation of angiogenesis and fracture reparation.

Key words: osteoclast, osteoblast, osteocytes, cytokines. ***Veterinaria Zacatecas* 2010; 149-173**

**Keywords: Fractures, resolution, small animals**

## COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DE LA YEGUA

María del Sol Méndez Bernal, Francisco Guadalupe Méndez Bernal, Federico de la Colina Flores, Francisco Javier Escobar Medina

Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Zacatecas  
E-mail: [fescoabar@uaz.edu.mx](mailto:fescoabar@uaz.edu.mx)

### RESUMEN

La yegua presenta comportamiento reproductivo estacional, con intervalos entre ovulaciones durante los días con mayor cantidad de horas luz y anestro en otoño e invierno. El ciclo reproductivo se compone de intervalo entre ovulaciones, gestación y período posparto. En los intervalos entre ovulaciones se presenta el crecimiento folicular, la ovulación, formación del cuerpo lúteo con producción de progesterona y destrucción del cuerpo lúteo e inicio de un nuevo intervalo. La mayor fertilidad con monta natural se presenta 1 a 2 días antes de la ovulación y con inseminación artificial alrededor de la ovulación. Las yeguas nuevamente ovulan poco tiempo después del parto.

Palabras clave: comportamiento reproductivo, yeguas, fertilidad

---

Veterinaria Zacatecas 2010; 3: 135-147

### INTRODUCCIÓN

La reproducción en la yegua se realiza por medio de interacción entre ambiente y organismo. La influencia del ambiente se transmite a través de los sentidos y el animal las recibe en el sistema nervioso central, particularmente en hipotálamo para, por un lado, la secreción de hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH);<sup>1-3</sup> y desencadenar el concierto hormonal que conduce a la ovulación, y, por otro, estimular la secreción de melatonina para programar la estacionalidad reproductiva.<sup>4-6</sup>

La GnRH se dirige al lóbulo anterior de la hipófisis para promover la síntesis y secreción de gonadotropinas: hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH).<sup>1-3</sup>

Las gonadotropinas promueven el desarrollo folicular, la FSH hasta la desviación y LH al nivel preovulatorio.<sup>7</sup> Los folículos producen estradiol e inhibina. El estradiol ejerce retroalimentación negativa sobre las gonadotropinas<sup>8</sup> y la inhibina sobre FSH.<sup>9</sup> La LH, además, se relaciona con la ovulación.<sup>5</sup> En las yeguas sin gestación y bajo condiciones adecuadas para la reproducción, las ovulaciones (acompañadas de celo) se repiten para constituir el período entre ovulaciones o intervalo interovulatorio.

Después de la ovulación se desarrolla el cuerpo lúteo, estructura que produce progesterona.

Ésta ejerce retroalimentación negativa sobre gonadotropinas.<sup>10</sup> El endometrio secreta prostaglandina  $F_2\alpha$  para destruir el cuerpo lúteo al final del intervalo entre ovulaciones en yeguas sin gestación.<sup>11,12</sup>

Las yeguas pueden recibir monta natural o inseminación artificial en el momento apropiado del celo y concebir. El producto se desarrolla durante la gestación y, después de 11 meses, se presenta el parto.

Con base en lo anterior, el ciclo reproductivo de la yegua se compone de intervalo entre ovulaciones, gestación y período posparto. El fotoperíodo a través de la secreción de melatonina, programa el intervalo entre ovulaciones en una temporada específica, lo que en el presente documento se conoce como temporada reproductiva, y establece el comportamiento reproductivo estacional.

### TEMPORADA REPRODUCTIVA

Las yeguas son poliéstricas estacionales, presentan celos acompañados de ovulación en los días con mayor cantidad de horas luz y permanecen en anestro o período anovulatorio en los días con reducción del fotoperíodo.<sup>5,13-16</sup> El anestro se ha observado sistemáticamente en las yeguas jóvenes entre 2 y 3 años de edad y en las adultas con previo amamantamiento. No todas las hembras mayores de 3 años de edad, sin lactancia

previa, han mostrado anestro en el otoño y en el invierno; el 50% de éstas pueden presentar ovulaciones acompañadas de celo durante los días con reducción del fotoperiodo.<sup>17,18</sup> El mayor porcentaje de yeguas concibieron de abril – agosto, en un estudio realizado después del sacrificio de yeguas procedentes de los Estados de Coahuila, Nuevo León, Durango, Tamaulipas, San Luis Potosí, Jalisco, Aguascalientes y Zacatecas. Por lo tanto, los partos ocurrieron de marzo a julio.<sup>14</sup>

Las yeguas utilizan el fotoperiodo para programar sus partos en primavera, temporada más favorable para la supervivencia de su descendencia.<sup>5,19</sup> La señal probablemente se realiza como en otras especies: las horas luz se registren en retina y el estímulo se transmita sucesivamente al núcleo supraquiasmático del hipotálamo, ganglio cervical superior y glándula pineal. La glándula pineal actúa como traductor neuroendocrino, convierte la señal neural en secreción hormonal.<sup>20-22</sup> Esta glándula produce melatonina durante las horas oscuras del día,<sup>5</sup> y la melatonina, dependiendo del período de su secreción, actúa sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada.<sup>4,6</sup> Por ejemplo, el período de secreción de melatonina es más largo durante otoño e invierno coincide con la temporada de anestro en la yegua. Por lo tanto, períodos largos de secreción de melatonina inhiben la presentación de celos.<sup>23</sup>

En algunas explotaciones los partos se prefieren al inicio del año, antes de la época

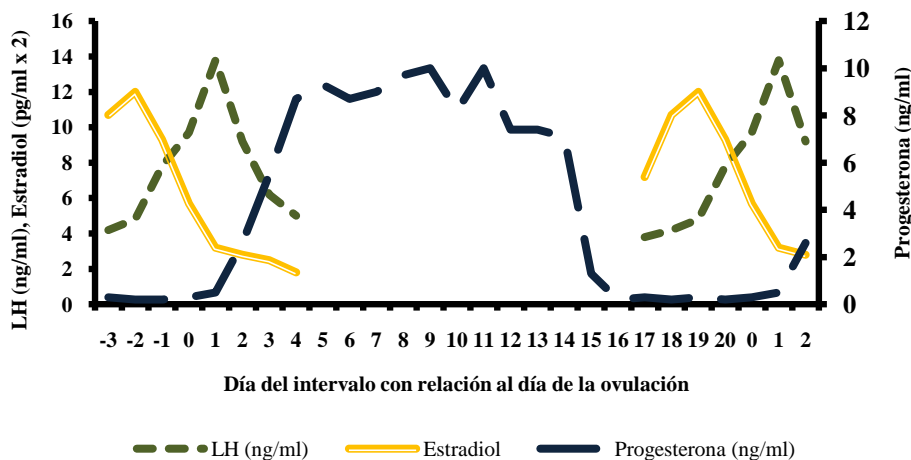
natural en estos animales. Para modificarles la temporada se han utilizado principalmente tratamientos con luz artificial, adicional al fotoperiodo natural.<sup>24-27</sup> En un estudio las cópulas se programaron del 15 de febrero al 30 de junio para esperar los partos en los 4 primeros meses del año (enero-mayo). Las hembras sin concepción se trataron con 16 horas luz del 1 de diciembre al 31 de enero. El 35.7%, 17.8%, 19.4%, 14.7% y 12.4% de los partos se presentaron en enero, febrero, marzo, abril y mayo, respectivamente.<sup>28</sup>

### INTERVALO INTEROVULATORIO

Este intervalo inicia en una ovulación asociada al estro y termina con la ovulación del ciclo siguiente, anteriormente se conocía como ciclo estral. Se decidió utilizar el término de intervalo entre ovulaciones para identificar con mayor exactitud los días en que se realiza el crecimiento folicular y eliminar la ambigüedad asociada con los métodos utilizados para detección y definición del estro. El intervalo entre ovulaciones, en yeguas dura en promedio 21 a 22 días y 24 días en las ponis.<sup>5</sup>

En el intervalo interovulatorio se realiza crecimiento folicular con producción de estradiol, ovulación, formación de cuerpo lúteo con producción de progesterona y destrucción del cuerpo lúteo e inicio de un nuevo intervalo. Los niveles hormonales del intervalo se presentan en la Figura 1.

**Figura 1. Nivel de estradiol,<sup>29</sup> LH<sup>29</sup> y progesterona<sup>30</sup> en el intervalo interovulatorio de la yegua**

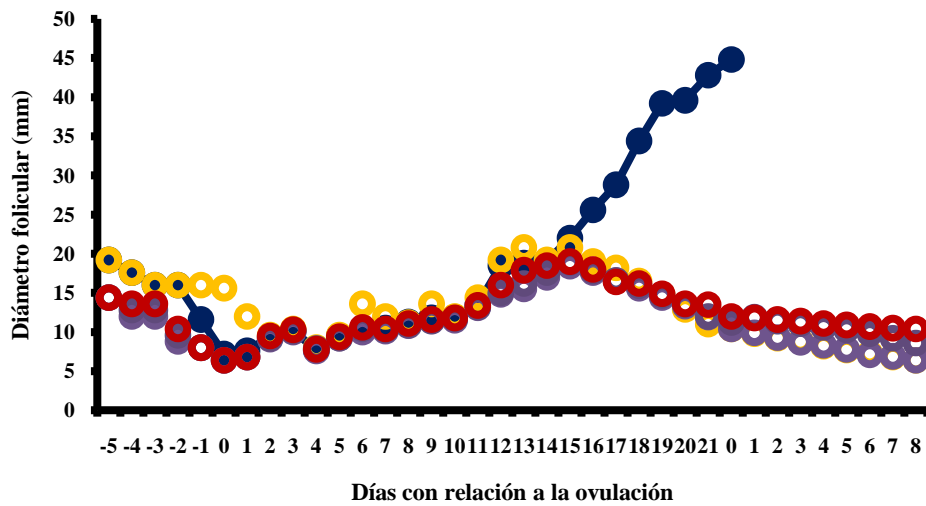


## CRECIMIENTO FOLICULAR

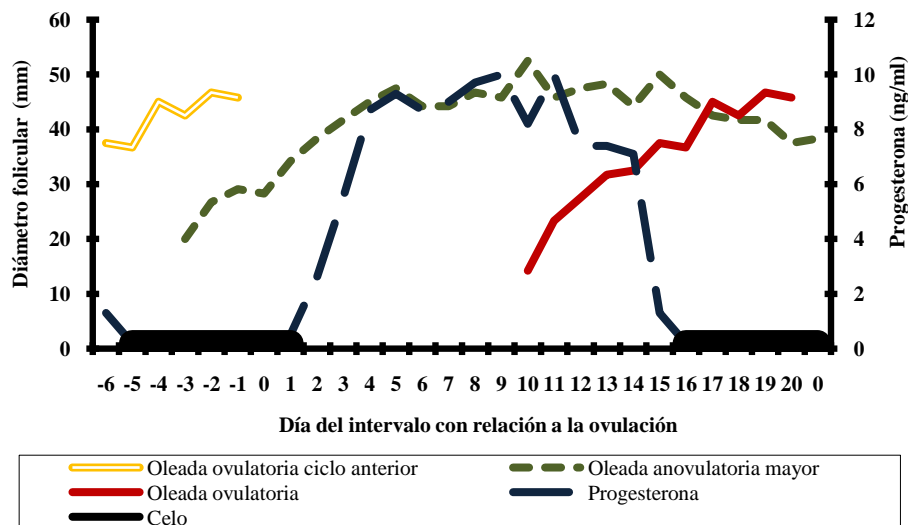
El crecimiento folicular en la yegua se lleva a cabo en oleadas u ondas. Las oleadas inician su desarrollo en la parte media del intervalo interovulatorio y culmina con la ovulación (oleada ovulatoria; Figura 2), y por lo general sólo se presenta una onda en cada intervalo.<sup>31</sup> Sin embargo, el 24% de las yeguas

cuarto de milla<sup>33</sup> y 25% de Bretón Brasileño<sup>33</sup> han presentado una onda sin ovulación antecedente a la ovulatoria (oleada anovulatoria mayor; Figura 3), se desarrolla durante la primera parte del intervalo entre ovulaciones.<sup>34</sup> Además, se ha identificado la baja incidencia ( $\leq 25\%$ ) de oleadas menores (folículos 22 a 23 mm) en diferentes partes del intervalo interovulatorio, de folículos que no llegar a la etapa dominante<sup>32-34</sup> (Figura 4).

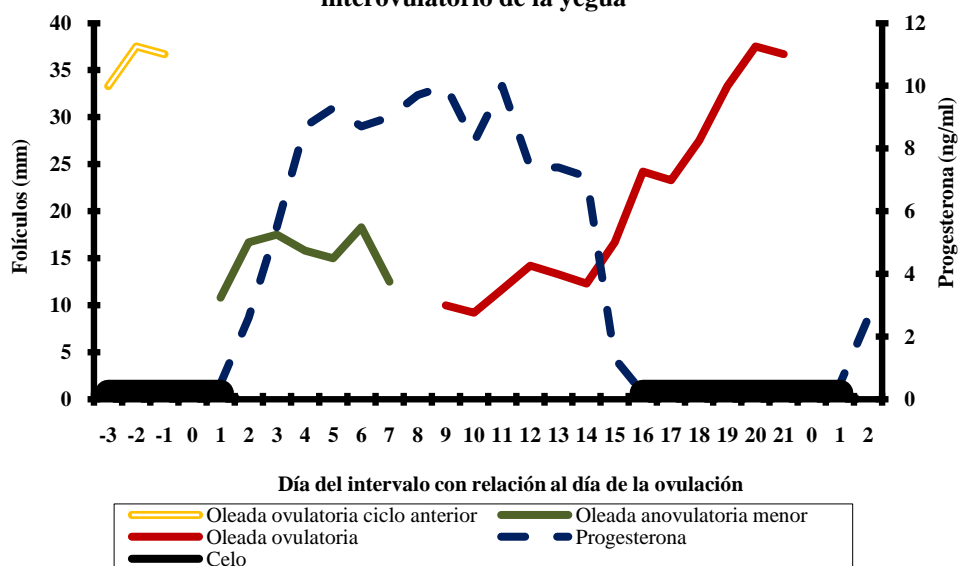
**Figura 2. Intervalo interovulatorio en la yegua con una oleada de crecimiento folicular<sup>31</sup>**



**Figura 3. Folículos dominantes<sup>33</sup> y concentración de progesterona<sup>30</sup> en el intervalo interovulatorio de la yegua**



**Figura 4. Crecimiento folicular con una oleada menor antes de la ovulatoria<sup>32</sup> y concentración de progesterona<sup>30</sup> en el intervalo interovulatorio de la yegua**



Cada oleada, pese a tratarse de un proceso continuo, para su estudio se puede dividir en cuatro fases o períodos: común de crecimiento, desviación o selección, dominancia y ovulación.

La fase común de crecimiento se desarrolla de la identificación de los folículos mediante ultrasonografía, generalmente con 6 mm de diámetro, hasta la desviación. En esta parte del proceso, los folículos aumentan su tamaño de manera uniforme, 2.8 mm/día, y ninguno influye sobre el crecimiento de sus compañeros.<sup>35</sup> Todos los folículos de cada oleada presentan la capacidad para continuar su crecimiento y participar en la siguiente fase del desarrollo folicular. Sin embargo, sólo uno (u ocasionalmente más)<sup>36</sup> lo hará; los demás pierden esta capacidad aproximadamente 48 horas después del inicio de la desviación y sufren atresia.<sup>37</sup> Los primeros en aparecer, debido al crecimiento uniforme durante esta etapa, alcanzan antes el tamaño para la desviación.<sup>35</sup> Por lo tanto, presentan mayor probabilidad de continuar su crecimiento; la probabilidad aumenta conforme se aproxima el diámetro esperado para el inicio de la desviación. En el 60% de las oleadas, el folículo de mayor tamaño continúa su crecimiento; en los casos restantes, el folículo mayor detiene (o ligeramente reduce) su incremento de tamaño durante la fase de crecimiento común y lo

reemplaza el segundo más grande, en ocasiones lo puede reemplazar uno de menor tamaño.<sup>37</sup>

La FSH estimula el crecimiento folicular durante la fase común, su concentración sanguínea se incrementa paulatinamente del período previo a la identificación de las oleadas por ultrasonografía<sup>31</sup> a 3 días anteriores a la fecha esperada para la desviación.<sup>7</sup> Los folículos en este día llegan a medir 13 mm de diámetro.<sup>35,38</sup> Posteriormente, la concentración sanguínea de FSH disminuye pero con nivel suficiente para impulsar el desarrollo del futuro folículo dominante hasta el diámetro esperado para la desviación (22 mm) pero incapaz de promover el crecimiento de los demás folículos, los cuales sufren atresia debido a la falta de apoyo hormonal.<sup>31,39</sup> Este ambiente endocrino es la base de la desviación folicular. La inhibina y el estradiol producidos en el folículo dominante ejercen retroalimentación negativa sobre la secreción de FSH,<sup>7,9,40,41</sup> incluso en forma sinérgica.<sup>8,42,43</sup> La continua reducción de FSH, como sucede en esta parte del proceso, conduce a daño morfológico y funcional de los folículos subordinados.<sup>10,38</sup> Aplicación de FSH exógena<sup>44</sup> o inmunización contra inhibina<sup>45</sup> conllevan a la supresión de la desviación folicular y por consiguiente al desarrollo de múltiples folículos ovulatorios.

En la desviación o selección folicular un miembro de la oleada (ocasionalmente dos) continúa su crecimiento, los demás se atresian.<sup>10,31,35,46</sup> Al folículo seleccionado se le conoce como dominante,<sup>33</sup> el cual mantiene su crecimiento constante hasta uno a dos días antes de la ovulación y ovula (oleada ovulatoria) o sufre atresia (oleada anovulatoria mayor). Los folículos restantes (subordinados) sufren atresia.<sup>33,47,48</sup> El folículo dominante incrementa su tamaño de 2.5 a 3 mm por día después de la luteólisis, velocidad de crecimiento similar al registrado en la fase común. Por consiguiente, el folículo llega a medir de 40 a 45 mm el día previo a la ovulación.<sup>31,32</sup> Existe alta correlación en el diámetro folicular durante 3 días previos a la ovulación, así como en la concentración de FSH y LH en el mismo individuo, en oleadas espontáneas<sup>49</sup> e inducidas consecutivamente.<sup>36</sup> La tasa de crecimiento del folículo ovulatorio disminuye la víspera de la ovulación, en yeguas con una y dos ovulaciones.<sup>47,48,50</sup> Según los estudios realizados con aplicación ovulatoria de hCG,<sup>47,48</sup> el inicio de la reducción del diámetro folicular ha coincidido con el mayor nivel de LH del pulso ovulatorio.

La FSH únicamente apoya el desarrollo folicular hasta la desviación, la tarea de promover el crecimiento del folículo dominante corresponde a LH.<sup>7,35</sup> La concentración sanguínea de LH se incrementa antes de la desviación en yeguas con períodos interovulatorios,<sup>7</sup> y su incremento también se ha relacionado con estimulación de folículos dominantes al final del anestro estacional.<sup>51</sup> Los folículos dominantes suplen el efecto de FSH para la síntesis de estradiol mediante receptores para LH en las células de la granulosa.<sup>52</sup> Por lo tanto, dependen de esta hormona para su crecimiento.

Los factores de crecimiento parecido a la insulina-I (IGF-I) y vascular endotelial (VEGF) también participan en la desviación folicular. El IGF-I estimula proliferación en las células de la granulosa y realiza sinergia con gonadotropinas para promover diferenciación de células foliculares.<sup>53</sup> La concentración de IGF-I libre se incrementa diferencialmente en el futuro folículo dominante antes del inicio de la desviación<sup>54</sup> e incluso estimula su desarrollo en animales con bajo nivel de gonadotropinas.<sup>55</sup> Aplicación de IGF-I al folículo subordinado más grande (o a otro pequeño) le cambia su destino, lo transforma en co-dominante, y por consiguiente promueve el desarrollo de múltiples folículos ovulatorios.<sup>33,56-58</sup> Además, su nivel disminuye en los folículos

dominantes en el período de transición al anestro en primavera.<sup>59,60</sup> El proceso contrario se presenta con aplicación de proteína ligadora de IGF-3 (IGFBP-3) dentro del futuro folículo dominante al inicio de la desviación, también le cambia su destino, sufre regresión y lo reemplaza el subordinado más grande.<sup>61</sup> Las IGFBPs (en la yegua -2, -4 y -5) se unen a la IGF-I para impedirle la unión a su receptor e inactivarla,<sup>62</sup> por consiguiente regulan negativamente la función de IGF en el desarrollo folicular.<sup>63,64</sup>

El VEGF se incrementa en el folículo dominante y su aumento parece en parte mediado por IGF-I.<sup>65</sup> Se cree que VEGF se involucra en el incremento de vascularización del futuro folículo dominante antes del inicio de la desviación, lo cual presumiblemente aumenta la disponibilidad de gonadotropinas circulantes al folículo.<sup>59</sup> El nivel de VEGF en el folículo y la vascularización en la pared del folículo dominante se reducen durante la transición de primavera hacia la temporada de anestro.<sup>66</sup>

Ocasionalmente se desarrollan varios folículos dominantes con una o dos ovulaciones. En el caso de una ovulación, se desarrollan dos folículos dominantes de 28 a 30 mm de diámetro, uno de los cuales ovula y el otro reduce su crecimiento y se atresia.<sup>32,35,46</sup> En el caso de dos ovulaciones, dos folículos dominantes ovulan,<sup>33</sup> sin alterar la duración del intervalo interovulatorio.<sup>50,67</sup> La incidencia de dos folículos dominantes se ha encontrado en el 20% de yeguas Breton,<sup>29,33</sup> 30% en ponis grandes,<sup>36</sup> no se ha observado su presencia en yeguas poni miniatura<sup>68</sup> y no disponemos información en yeguas Warmblood y Pura Sangre Inglés. La presencia de dos folículos dominantes no se ha relacionado con el nivel hormonal. La concentración plasmática de LH, estradiol e inhibina inmunoreactiva no ha variado en las yeguas con uno o dos folículos dominantes (pero sin ovulaciones dobles) en el mismo intervalo interovulatorio, aunque se ha encontrado menor nivel de FSH en yeguas con dos folículos dominantes.<sup>29</sup>

También se han encontrado casos con múltiples folículos ovulatorios.<sup>36</sup> Estos folículos miden  $\geq 20$  mm al inicio de la desviación y las yeguas en ese día presentan LH más elevada y FSH con menor concentración. La presencia de varios folículos ovulatorios conduce a mayor producción de estradiol dos días posteriores a la desviación. Durante el período periovulatorio, se registra estradiol con mayor nivel antes de la desviación, FSH con menor concentración antes y

después de la ovulación, menor nivel de LH, así como progesterona con mayor secreción del día posterior a la ovulación en adelante. Estos hallazgos coinciden con la teoría que mayor nivel de LH previo a la desviación favorece el crecimiento de múltiple folículos estrogénicamente activos ( $\geq 20$  mm de diámetro) en la desviación y, como consecuencia, desarrollo de ovulaciones múltiples.<sup>36</sup>

## OVULACIÓN

La ovulación en la yegua se realiza de 24 a 48 horas antes del fin del estro, con variación del diámetro folicular entre 35 a 55 mm.<sup>32,69</sup> Es decir, tiene más relación con el fin que con el inicio del estro.

La concentración hormonal alrededor de la ovulación es como sigue: el pulso ovulatorio de LH se incrementa lentamente y presenta un aumento considerable de 48 horas antes a un día después de la ovulación (Figura 1); registra su máximo nivel el día posterior a la ovulación.<sup>49</sup> La FSH muestra un incremento ligero que coincide con el inicio del aumento considerable de LH y la reducción de estradiol, dos días previos a la ovulación.<sup>49</sup> El incremento de gonadotropinas se debe a la reducción de la retroalimentación negativa del estradiol.<sup>4,42,43,47,50,70-72</sup> El estradiol presenta su mayor concentración dos días antes de la ovulación y después disminuye significativamente (Figura 1).<sup>49</sup> La inhibina también ejerce retroalimentación negativa sobre FSH, su liberación en cavidad abdominal durante la ruptura folicular, interrumpe de 12 horas antes a 12 horas después de la ovulación, el incremento de FSH iniciado previamente.<sup>8,73</sup> Después de esta ligera interrupción, la concentración de FSH se continúa incrementando.<sup>49</sup> El máximo nivel de inhibina coincide con la ovulación.<sup>8,73-75</sup> El estradiol y la inhibina presentan efecto sinérgico sobre la supresión de FSH.<sup>8,42,43</sup> La progesterona se incrementa paulatinamente después de la ovulación y ejerce retroalimentación negativa sobre LH, por consiguiente el nivel de LH se reduce después de haber alcanzado su máxima concentración un día posterior a la ovulación.<sup>49</sup>

## FORMACIÓN DEL CUERPO LÚTEO

Después de la ovulación, en el lugar donde se realizó la ruptura folicular se forma el cuerpo lúteo.

El pulso ovulatorio de LH, además de provocar la ruptura folicular, también luteiniza las

células de la pared folicular para la formación del cuerpo lúteo. El cuerpo lúteo produce progesterona y su vida es limitada. La prostaglandina  $F_2 \alpha$  lo destruye al final del intervalo entre ovulaciones. La producción hormonal del cuerpo lúteo se inicia al principio del intervalo y cuando la concentración de esta hormona es superior a 1 ng/ml en la circulación sanguínea inhibe la manifestación del estro.<sup>13,76</sup> Esto ocurre de 1 a 2 días después de la ovulación. La concentración hormonal continúa incrementándose hasta alcanzar del día 6 al 14 o 15 su nivel más elevado, 8 a 10 ng/ml (Figura 1).<sup>77-80</sup> La progesterona promueve la secreción del endometrio, con lo cual prepara el útero para la gestación, presenta retroalimentación negativa sobre la secreción hipotalámica de GnRH (a través de opioides endógenos)<sup>81</sup> e inhibe el comportamiento del estro.

## DESTRUCCIÓN DEL CUERPO LÚTEO

La prostaglandina  $F_2 \alpha$  se produce en el endometrio uterino y destruye el cuerpo lúteo.<sup>82,83</sup> Por lo tanto, se reduce rápidamente la concentración de progesterona en la circulación sanguínea y con esto la yegua puede presentar otro celo y por consiguiente tener otra oportunidad de concebir en el inicio de un nuevo intervalo entre ovulaciones.<sup>84</sup> La yegua es muy sensible a la acción de la prostaglandina  $F_2 \alpha$ , la luteólisis se inicia con la más pequeña secreción de esta hormona.<sup>85</sup>

## GESTACIÓN

La duración de la gestación en la yegua varía de 340 a 345 días. El mayor porcentaje de concepciones se ha encontrado en servicios con monta natural 1 a 2 días antes de la ovulación. El porcentaje se reduce ligeramente en servicios realizados el día de la ruptura folicular y disminuye aún más 3 días antes a la ovulación.<sup>5</sup>

En estudios realizados con semen refrigerado, la mayor fertilidad en la yegua (57.8% de concepciones) se ha localizado con inseminaciones realizadas el día previo a la ovulación.<sup>86</sup> El porcentaje de concepción se reduce al 28.6% y 18.2% en servicios llevados a cabo 24-36 y 36-48 horas posteriores a la ruptura folicular, respectivamente.<sup>86</sup> En otro estudio más detallado, realizado con semen refrigerado,<sup>87</sup> el 29.4% y 60% de las yeguas concibieron con

servicios realizados entre 36-24 y 24-0 horas antes de la ovulación, y 66.7% y 70.1% entre 0-8 y 8-16 horas posteriores a la ruptura folicular, respectivamente. Se encontró buena fertilidad en las yeguas inseminadas después de la ovulación pero se incrementó la mortalidad embrionaria: 11.8% en las hembras inseminadas entre 8 – 16 horas después del servicio. Porcentaje estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ) en comparación con el obtenido (7.1%) de las yeguas inseminadas entre 0-8 horas posteriores a la ruptura folicular. Otros autores también han observado mortalidad embrionaria en yeguas inseminadas después de la ovulación.<sup>88,89</sup>

El embrión llega al útero 5 a 6 días posteriores a la ovulación para realizar el reconocimiento materno de la gestación. Lo realiza para evitar la función de la prostaglandina  $F_2\alpha$  y por consiguiente impedir la destrucción del cuerpo lúteo.<sup>90-93</sup> La progesterona de origen ovárico, particularmente del cuerpo lúteo, es necesaria para mantener la primera parte de la gestación. La yegua puede ovular en los primeros meses de la preñez y formar cuerpos lúteos secundarios. La progesterona de estas estructuras contribuye al mantenimiento de la gestación.<sup>95</sup>

En la yegua, además, se forman las copas endometriales a los 35 días de la preñez<sup>94</sup> y producen gonadotropina coriónica equina. La concentración sérica de esta gonadotropina registra su mayor nivel entre los días 60 y 65 de la gestación; posteriormente reduce su concentración y desaparece de la circulación alrededor del día 150.<sup>95</sup> La gonadotropina coriónica equina es luteotrópica, promueve la secreción de progesterona en los cuerpos lúteos (primario y secundarios);<sup>96,97</sup> su ausencia en la parte media de la preñez conduce a la desaparición de los cuerpos lúteos y por consiguiente al cese de la producción ovárica de progesterona,<sup>77,98</sup> y la producción de progesterona para mantener la gestación queda a cargo de la unida feto-placenta.<sup>99</sup>

La unidad feto-placenta, además, produce estrógenos a partir del día 60, éstos alcanzan su mayor concentración sérica el día 210 de la gestación y posteriormente disminuyen.<sup>100</sup> También produce relaxina; esta hormona incrementa su concentración dos ocasiones. La primera comienza del día 75 al 80, con duración de 160 días y mayor nivel en el 180 de la gestación. La segunda del 240 al parto.<sup>101</sup> La gestación culmina con el parto, el cual generalmente se presenta en la primavera, como

ocurre en las demás especies de reproducción estacional.<sup>102</sup>

## PERÍODO POSPARTO

La yegua después del parto involuciona el útero y reanuda su actividad interovulatoria. La involución uterina, proceso en que el útero disminuye de volumen y recupera el tamaño que tenía en el período pre-grávido, se desarrolla en corto tiempo después del parto. Doce horas después, el cuerno uterino grávido presenta únicamente el 50% de tamaño que el opuesto, y la reducción de sus dimensiones se comparan con el tamaño previo a la gestación alrededor del primer celo posparto.<sup>103</sup> En el intervalo entre parto y primer celo (conocido como celo del potro) se observa hiperemia intensa y secreciones oscuras en el canal del cérvix, las cuales pueden persistir incluso después del primer estro posparto.<sup>104</sup> El 24% de las yeguas eliminan exudado vaginal sanguinolento y mucopurulento después del celo del potro.<sup>105</sup> El crecimiento folicular después del parto incrementa la concentración plasmática de estrógenos, los cuales estimulan leucocitosis y particularmente acción de neutrófilos y fagocitos en el lumen uterino.<sup>103</sup> La involución anatómica se completa en el día 14 posparto, pero la histológica hasta el 32.<sup>104,106</sup> La involución uterina se ha intentado acelerar con aplicación de prostaglandina  $F_2\alpha$ <sup>107,108</sup> y oxitocina<sup>109,110</sup> para incrementar la frecuencia de sus contracciones, aunque no siempre con resultados exitosos.

Las yeguas reanudan su actividad ovulatoria con el primer estro de 4 a 8 días después del parto.<sup>111</sup> La incidencia de concepciones en este celo es más baja que en los subsiguientes,<sup>112</sup> lo cual se debe a la incompleta involución y regeneración uterina en el momento del primer celo posparto.<sup>113,114</sup>

## REFERENCIAS

1. Alexander SL, Irvine CHG. Secretion rates and short-term patterns of gonadotropin-releasing hormone, FSH and LH throughout the periovulatory period in the mare. *J Endocrinol* 1987; 114: 351-362.
2. Irvine CHG, Alexander SL. Secretory patterns and rates of gonadotropin-releasing hormone, follicle stimulating hormone, and luteinizing hormone revealed by intensive sampling of pituitary venous blood in the luteal phase

- mare. *Endocrinology* 1993; 132: 212-218.
3. Irvine CHG, Alexander SL. The dynamics of gonadotropin-releasing hormone, LH and FSH secretion during the spontaneous ovulatory surge of the mare as revealed by intensive sampling of pituitary venous blood. *J Endocrinol* 1994; 140: 283-295.
  4. Strauss SS, Chen CL, Karla SP, Sharp DC. Depletion of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ovariectomized mares following melatonin implants. *Fed Proc* 1978; 37: 225.
  5. Ginther OJ. *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects* 2nd ed. Cross Plains, WI: Equiservices, 1992.
  6. Sharp DC, Grubaugh W, Berglund LA, Seamans KW, McDowell KJ, Kilmer DM, Peck LS. The interaction of photoperiod and pineal gland on seasonal reproductive patterns in mares. In: *Photoperiod and Reproduction*. Brussels: INRA Publ 2002: 201-212.
  7. Bergfelt DR, Gastal EL, Ginther OJ. Response of estradiol and inhibin to experimental reduced luteinizing hormone during follicle deviation in mares. *Biol Reprod* 2001; 65: 426-432.
  8. Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. Passage of postovulatory follicular fluid into the peritoneal cavity and the effect on concentrations of circulating hormones in mares. *Anim Reprod Sci* 2008; 107: 1-8.
  9. Bergfelt DR, Ginther OJ. Delayed follicular development and ovulation following inhibition of FSH with equine follicular fluid in the mare. *Theriogenology* 1985; 24: 99-108.
  10. Gastal EL, Gastal MO, Wiltbank MC, Ginther OJ. Follicular deviation and intrafollicular and systemic estradiol concentrations in mares. *Biol Reprod* 1999; 61: 31-39.
  11. Ginther OJ, Rodrigues BL, Ferreira JC, Araujo RR, Beg MA. Characterization of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. *Reprod Fertil Dev* 2008; 20: 684-693.
  12. Ginther OJ, Beg MA. Concentrations of circulating hormones normalized to pulses of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  metabolite during spontaneous luteolysis in mares. *Theriogenology* 2009; 72: 1111-1119.
  13. Ginther OJ. Occurrence of anestrus, estrus, diestrus and ovulation over 12 months period in mares. *Am J Vet Res* 1974; 35: 1173-1179.
  14. Orozco JL, Escobar FJ, de la Colina F. Actividad reproductiva de la yegua y la burra durante los días con menor cantidad de horas luz. *Veterinaria México* 1992; 23: 47-50.
  15. Escobar FJ. Estacionalidad reproductiva de la yegua. *Veterinaria Zacatecas* 2002; 2: 29-39.
  16. Escobar MFJ. Comportamiento reproductivo de la yegua y la burra. *Veterinaria Zacatecas* 1997; 1: 22-26.
  17. Palmer E, Driancourt MA. Some interactions of seasonal of foaling, photoperiod and ovarian activity in the equine. *Livest Prod Sci* 1983; 10: 197-210.
  18. Koskinen E, Katila T. Onset of luteal activity in non-foaling mares during the early breeding season in Finland. *Acta Vet Scand* 1991; 32: 319-325.
  19. Palmer E, Guillaume D. Photoperiodism in the equine species – what is a long night? *Anim Reprod Sci* 1992; 28: 21-30.
  20. Bittman EL, Karsh FJ, Hopkins JW. Role of the pineal gland in ovine photoperiodism: regulation of seasonal breeding and negative feedback effects on estradiol upon luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 1983; 113: 329-336.
  21. Lincoln GA. The pineal gland. In Austin CR, Short RV, editors. *Hormonal Control of Reproduction*. Cambridge: Cambridge University Press 1984: 52-75.
  22. Malpoux B, Delgadillo JA, Chemineau P. Neuroendocrinología del fotoperiodo en el control de la actividad reproductiva. *Memorias del Seminario Internacional: Tópicos Avanzados en Reproducción Animal*; 1997 septiembre 12; Montecillo (Edo Mex) México; Colegio de Postgraduados 1997: 23-42.
  23. Irvine CHG, Alexander SL. The role of environmental factor in reproduction in the mare. *Arch Vet* 1994; 10: 33-41.

24. Oxender WD, Noden PA, Hafs HD. Estrus, ovulation and serum progesterone, estradiol and LH concentrations in mares after an increased photoperiod during winter. *Am J Vet Res* 1977; 38: 203-207.
25. Malinowski K, Johnson AL, Scanners CG. Effects of interrupted photoperiods on the induction of ovulation in anestrus mares. *J Anim Sci* 1985; 61: 951-955.
26. Kooistra LH, Ginther OJ. Effect of photoperiod on reproductive activity and hair in mares. *Am J Vet Res* 1975; 36: 1413-1419.
27. Nequin LG, King SS, Matt KS, Jurak RC. The influence of photoperiod on gonadotrophin-releasing hormone stimulated luteinizing hormone release in the anestrus mares. *Equine Vet J* 1990; 22: 356-358.
28. Vázquez-Dueñas S, Escobar-Medina FJ, de la Colina-Flores F, Hayden-Valles S. Comportamiento reproductivo de yeguas Pura Sangre Inglés en un criadero con partos al principio del año. *Rev Biomed* 2004; 15: 27-31.
29. Jacob JC, Gastal EL, Gastal MO, Berg MA, Ginther OJ. Follicle deviation in ovulatory follicular waves with one or two dominant follicles in mares. *Reprod Domest Anim* 2009; 44: 248-254.
30. Neely DP. Reproductive endocrinology and fertility in the mare. In: Neely DP, Liu IKM, Hillman RB. *Equine reproduction*. New Jersey: Hoffmann-La Roche Inc, 1983: 12-22.
31. Ginther OJ, Beg MA, Donadeu FX, Bergfelt DR. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci* 2003; 78: 239-257.
32. Ginther OJ. Major and minor follicular waves during the equine estrous cycle. *J Equine Vet Sci* 1993; 13: 18-25.
33. Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Bergfelt DR, Baerwald AR, Pierson RA. Comparative study of dynamics of follicular waves in mares and women. *Biol Reprod* 2004; 71: 1195-1201.
34. Bergfelt DR, Ginther OJ. Relationships between FSH surges and follicular waves during the estrous cycle in mares. *Theriogenology* 1993; 39: 781-796.
35. Gastal EL, Gastal MO, Bergfelt DR, Ginther OJ. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. *Biol Reprod* 1997; 57: 1320-1327.
36. Ginther OJ, Jacob JC, Gastal MO, Gastal EL, Beg MA. Development of one versus multiple ovulatory follicles and associated systemic hormone concentrations in mares. *Reprod Domest Anim* 2009; 44: 441-449.
37. Gastal EL, Gastal MO, Beg MA, Ginther OJ. Interrelationships among follicles during common-growth phase of a follicular wave and capacity of individual follicles for dominance in mares. *Reproduction* 2004; 128: 417-422.
38. Donadeu FX, Ginther OJ. Effect of number and diameter of follicles on plasma concentrations of inhibin and FSH in mares. *Reproduction* 2001; 121: 897-903.
39. Checura CM, Beg MA, Gastal EL, Gastal MO, Wiltbank MC, Parrish JJ, Ginther OJ. Effect of suppression of FSH with a GnRH antagonist (acyline) before and during follicle deviation in the mare. *Reprod Domest Anim* 2009; 44: 504-511.
40. Miller KF, Wesson JA, Ginther OJ. Changes in concentration of circulating gonadotropins following administration of equine follicular fluid to ovariectomized mares. *Biol Reprod* 1979; 21: 869-872.
41. Watson ED, Thomassen R, Steele M, Herld M, Leask R, Groome NP, Riley SC. Concentrations of inhibin, progesterone and estradiol in fluid from dominant and subordinate follicles from mares during spring transition and the breeding season. *Anim Reprod Sci* 2002; 74: 55-67.
42. Miller KF, Wesson JA, Ginther OJ. Interaction of estradiol and a nonsteroidal follicular fluid substance in regulation of gonadotropin secretion in the mare. *Biol Reprod* 1981; 24: 354-358.
43. Donadeu FX, Ginther OJ. Suppression of circulating concentrations of FSH and LH by inhibin and estradiol during the initiation of follicle deviation in mares. *Theriogenology* 2003; 60: 1423-1434.
44. Squires EL. Suproovulation in mares. *Vet Clin N Am: Eq Pract* 2006; 22: 819-830.
45. McCue PM, Carney NJ, Hughes JP, Ricier J, Vale W, Lasley BL. Ovulation

- and embryo recovery rates following immunization of mares against an inhibin  $\alpha$ -subunit fragment. *Theriogenology* 1992; 38: 823-831.
46. Ginther OJ, Gastal EL, Gastal OM, Bergfelt DR, Baerwald AR, Pierson RA. Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and women. *Biol Reprod* 2004; 71: 1195-1201.
  47. Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ. 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* 2006; 131: 699-709.
  48. Gastal EL, Silva LA, Gastal MO, Evans MJ. Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares. *Anim Reprod* 2006; 94: 186-190.
  49. Jacob JC, Gastal EL, Gastal MO, Carvalho GR, Beg MA, Ginther OJ. Temporal relationships and repeatability of follicle diameters and hormone concentrations within individuals in mares. *Reprod Dom Anim* 2009; 44: 92-99.
  50. Ginther OJ, Gastal EL, Rodrigues BL, Gastal MO, Beg MA. Follicle diameters and hormone concentrations in the development of single and double ovulation in mares. *Theriogenology* 2008; 69: 583-590.
  51. Donadeu FX y Watson ED. Seasonal changes in ovarian activity: lessons learnt from horse. *Anim Reprod Sci* 2007; 100: 225-242.
  52. Goudet G, Belin F, Bezaud J, Gerard N. Intrafollicular content of luteinizing hormone receptor,  $\alpha$ -inhibin, and aromatase in relation to follicular growth, estrous cycle stage, and oocyte competence for in vitro maturation in the mare. *Biol Reprod* 1999; 60: 1120-1127.
  53. Spicer LJ, Echternkamp SE. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with emphasis on domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 1995; 12: 223-245.
  54. Donadeu FX, Ginther OJ. Changes in concentration of follicular fluid factors during follicle selection in mares. *Biol Reprod* 2002; 66: 1111-1118.
  55. Checurea CM, Beg MA, Parrish JJ, Ginther OJ. Functional relationships among intrafollicular insulin-like growth factor 1, circulatory gonadotropins, and the development of the dominant follicle in mares. *Anim Reprod Sci* 2010; 118: 270-278.
  56. Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Meira C, Kot K. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor-I on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. *Biol Reprod* 2004; 70: 99-105.
  57. Gastal EL, Gastal MO, Donadeu FX, Acosta TJ, Beg MA, Ginther OJ. Temporal relationships among LH, estradiol, and follicle vascularization preceding the first compared with later ovulations during the year in mares. *Anim Reprod Sci* 2007; 102: 314-321.
  58. Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. Intrafollicular effect of IGF-1 on development of follicle dominance in mares. *Anim Reprod Sci* 2008; 105: 417-423.
  59. Acosta TG, Beg MA, Ginther OJ. Aberrant blood flow and plasma gonadotropins concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. *Biol Reprod* 2004; 71: 637-642.
  60. Watson ED, Bae SE, Thomassen R, Thomassen SR, Woad K, Armstrong DG. Insulin-like growth factor-I and -II and insulin-like growth factor-binding protein-2 in dominant equine follicles during spring transition and the ovulatory season. *Reproduction* 2004; 128: 321-329.
  61. Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Checurea CM, Beg MA. Dose-response study of intrafollicular injection of insulin-like growth factor-I on follicular fluid factors and follicle dominance in mares. *Biol Reprod* 2004; 70: 1063-1069.
  62. Armstrong BG, Webb R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev Reprod* 1997; 2: 139-146.

63. Gerard N, Monget P. Intrafollicular insulin-growth factor-binding protein levels in equine ovarian follicles during preovulatory maturation and regression. *Biol Reprod* 1998; 58: 1508-1514.
64. Bridges TS, Davidson TR, Chamberlain CS, Geisert RD, Spicer LJ. Changes in follicular fluid steroids, insulin-like growth factors (IGF) and IGF-binding protein concentration, and proteolytic activity during equine follicular development. *J Anim Sci* 2002; 80: 179-190.
65. Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Checura CM, Beg MA. Dose-response study of intrafollicular injection of insulin-like growth factor-I on follicular fluid factors and follicle dominance in mares. *Biol Reprod* 2004; 70: 1063-1069.
66. Watson ED, Al-zi'abi MO. Characterization of morphology and angiogenesis in follicles of mares during spring transition and the breeding season. *Reproduction* 2002; 124: 227-234.
67. Urbin VE, Allen WR. Follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and progesterone concentrations in the blood of Thoroughbred mares exhibiting single and twin ovulations. *Equine Vet J* 1983; 15: 325-329.
68. Gastal EL, Neves AP, Mattos RC, Petrucci BPL, Gastal MO, Ginther OJ. Miniature ponies: I. Follicular, luteal, and endometrial dynamics during the oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev* 2008; 20: 376-385.
69. Ginther OJ, Bergfelt DR. Growth of small follicles and concentration of FSH during the equine estrous cycle. *J Reprod Fertil* 1993; 99: 105-111.
70. Ginther OJ, Utt MD, Beg MA, Gastal EL, Gastal MO. Negative effect of estradiol on LH throughout the ovulatory LH surge in mares. *Biol Reprod* 2007; 77: 543-550.
71. Ginther OJ, Beg MA, Gastal EL, Gastal MO, Cooper DA. Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with a immediate 17 $\beta$ -estradiol decrease and more rapid LH increase in mares. *Anim Reprod Sci* 2009; 114: 311-317.
72. Ginther OJ, Almamun M, Shahiduzzaman AK, Beg MA. Disruption of the preovulatory LH surge by a transient increase in circulating 17 $\beta$ -estradiol at the time of ovulation in mares. *Anim Reprod Sci* 2010; 117: 178-182.
73. Nambo Y, Nagaoka K, Tanaka Y, Nagamine N, Shinbo H, Nagata S, Yoshihara T, Watanabe G, Groome N, Taya K. Mechanisms responsible for increase in circulating inhibin levels at the time of ovulation in mares. *Theriogenology* 2002; 57: 1707-1717.
74. Bergfelt DR, Mann BG, Schwartz NB, Ginther OJ. Circulating concentrations of immunoreactive inhibin and FSH during the estrous cycle of mares. *J Equine Vet Sci* 1991; 11: 319-322.
75. Roser JF, McCue PM, Hoye E. Inhibin activity in the mare and stallion. *Domest Anim Endocrinol* 1994; 11: 87-100.
76. Hughes JP. The oestrus cycle in the mare. *J Reprod Fertil* 1975; 23 (Suppl): 161-166.
77. Evans MJ, Irvine CHG. Serum concentrations of FSH, LH and progesterone during the oestrus cycle and early pregnancy in the mare. *J Reprod Fertil* 1975; 23 (Suppl): 193-200.
78. Beules G, Holdworth RJ. Progesterone in mares' milk. *Brit Vet J* 1978; 134: 214-211.
79. Hunt B, Lein DH, Foote RH. Monitoring of plasma and milk progesterone for evaluation of postpartum estrous cycles and early pregnancy in mares. *J Amer Vet Med Assoc* 1978; 172: 1298-1302.
80. Gunther JD, Foley CW, Gaverick HA, Plotka ED. Comparison of milk and blood plasma progesterone concentrations in cycling and pregnant mares. *J Anim Sci* 1980; 51: 1131-1138.
81. Irvine CHG, Alexander SL. Secretory patterns and rates of gonadotropin-releasing hormone, follicle stimulating hormone, and luteinizing hormone revealed by intensive sampling of pituitary venous blood in the luteal phase mare. *Endocrinology* 1993; 132: 212-218.
82. Ginther OJ, First NL. Maintenance of the corpus luteum in hysterectomized mares. *Am J Vet Res* 1971; 32: 1687-1691.

83. Stabenfeldt GH, Hughes JP, Wheat JD, Evans JW, Kennedy PC, Cupps PT. The role of the uterus in ovarian control of the mare. *J Reprod Fertil* 1974; 37: 343-351.
84. Neely DP, Kindahl H, Sabenfeldt GH, Edquist LE, Hughes JP. Prostaglandin release patterns in the mare: Physiological, patho-physiological, and therapeutics responses. *J Reprod Fertil* 1979; 27 (Suppl): 181-189.
85. Stabenfeldt GH, Kindahl H, Hughes JP, Neely DP, Liu I, Pascoe D. Control of luteolysis in the mare. *Acta Vet Scand* 1981; 77 (Suppl): 159-170.
86. Sieme H, Schäfer T, Stout TA, Klug E, Waberski D. The effect of different insemination regimens on fertility in mares. *Theriogenology* 2003; 1153-1164.
87. Newcome JR, Cuervo-Arango J. The effect of time of insemination with fresh cooled transported semen and natural mating relative to ovulation on pregnancy and embryo loss rate. *Reprod Dom Anim* (In press).
88. Woods J, Bergfelt DR, Ginther OJ. Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and early embryonic loss in mares. *Equine Vet J* 1990; 22: 410-415.
89. Barbacini S, Gulden P, Marchi V, Zavaglia G. Incidence of embryo loss in mares inseminated before or after ovulation. *Equine Vet Educ* 1999; 11: 251-254.
90. Van Niekerk CH. The early diagnosis of pregnancy, the development of foetal membranes and nidation in the mare. *J S Afr Vet Med Ass* 1965; 36: 483-488.
91. Ginther OJ. Mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology* 1983; 19: 603-611.
92. Watson ED, Bjorkstein TS, Buckingham J, Nikilakopoulos E. Immunolocalization of oxytocin in the uterus of the mare. *J Reprod Fertil Abstract Series* 1997; 20: 31.
93. Stout TAE, Lamming GE, Allen WR. The uterus as a source of oxytocin in cyclic mares. *J Reprod Fertil* 2000; 56 (Suppl): 281-287.
94. Allen WR, Hamilton DW, More RM. The origin of equine endometrial cups. II. Invasion of the endometrium by trophoblast. *Ant Rec* 1973; 117: 475-501.
95. Stewart F, Allen WR, Moor RM. Pregnant mare serum gonadotrophin: ratio of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay. *J Endocrinol* 1976; 71: 371-382.
96. Murphy BD, Martinuk SD. Equine corionic gonadotropin. *Endocr Rev* 1991; 12: 27-44.
97. Murphy BD. Models of luteinization. *Biol Reprod* 2000; 63: 2-11.
98. Allen WE. Ovarian changes during early pregnancy in pony mares in relation to PMSG production. *J Reprod Fertil* 1975; 23 (Suppl): 425-428.
99. Pashen RL, Allen WR. The role of the foeto gonads and placenta in steroid production in the mare. *J Reprod Fertil* 1979; 27 (Suppl): 499-509.
100. Cox JE. Oestrone and equilin in the plasma of the pregnant mare. *J Reprod Fertil* 1975; 23 (Suppl): 463-468.
101. Klonisch T, Mathias S, Hombach-Klonisch S, Ryan PL, Allen WR. Placental localization of relaxin in the pregnant mare. *Placenta* 1997; 18: 121-128.
102. Bronson FH, Heideman PD. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: Knobil E, Neil JD, editors. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994: 541-584.
103. Vandeplassche M, Bouters R, Spincemaille J, Boute P, Coryn M. Observations on involution and periparturient endometritis in mares. *Irish Vet J* 1983; 37: 126-132.
104. Gyax AP, Ganjam VQ, Kenny RM. Clinical, microbiological and histological changes associated with uterine involution in the mare. *J Reprod Fertil* 1979; 27 (Suppl): 559-571.
105. Koskinen E, Katila T. Uterine involution, ovarian activity and fertility in the postpartum mare. *J Reprod Fertil* 1987; 35 (Suppl): 704-705.
106. Kotilainen T, Kuusela E, Virtanen K, Katila T. Changes in the composition of uterine flushings in the postpartum mares. *J Reprod Fertil* 1991; 44 (Suppl): 704-705.
107. Ley WB, Purswell BJ. The effects of prostalene and alfaprostol as uterine myotonics, and the effect on the

- postpartum pregnancy rate in the mare followed daily treatment with prostalene. *Theriogenology* 1988; 29: 1113-1121.
108. Jones DM, Fielden ED, Carr DH. Some physiological and pharmacological factors affecting uterine motility as measured by electromyography in the mare. *J Reprod Fertil* 1991; 44 (Suppl): 357-358.
109. Blanchard TL, Varner DD, Brinsko SP, Quirk K, Rugula JN, Boehnke L. Effect of ecobolic agents on measurements of uterine involution in the mare. *Theriogenology* 1991; 36: 559-571.
110. Gündüz MC, Kasikci G, Kaya HH. The effect of oxytocin and prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  on the uterine involution and pregnancy rates in Arabian mares. *Anim Reprod Sci* 2008; 104: 257-263.
111. Matthews RG, Ropiha RT, Butterfield RM. The phenomenon of foal heat in mares. *Aust Vet J* 1967; 43: 579-582.
112. Merkt H, Günzel AR. A survey of early pregnancy losses in West German Thoroughbred mares. *Equine Vet J* 1979; 11: 256-258.
113. Tolksdorff E. Induction of ovulation during the postpartum period in the Thoroughbred mare with prostaglandin analogue Synchrocept. *Theriogenology* 1976; 6: 405-512.
114. Davies Morel MC, Newcombe JR, Hinchliffe J. The relationship of consecutive pregnancies in Thoroughbred mares. Does localization of one pregnancy affect the localization of the next, is this affected by mare age and foal heat to conception interval or related to pregnancy success. *Theriogenology* 2009; 71: 1072-1078.

#### ABSTRACT

**Méndez-Bernal MS, Méndez-Bernal FG, de la Colina-Flores F, Escobar-Medina FJ. Reproductive behavior in the mare.** Mares show a seasonal breeding behavior, with inter-ovulations periods during long days, and anestrus falls and winters. The reproductive cycle encompasses ovulations, pregnancy and postpartum period. Follicular growth, ovulation, the appearance of the corpus luteum, progesterone secretion and the destruction of the corpus luteum take place during the inter-ovulations periods. The best fertility results are achieved when natural mating occurs one or two days before ovulation, whereas artificial insemination attains its best figures around the ovulation time. Mares usually ovulate shortly after delivery. ***Veterinaria Zacatecas* 2010; 3: 135-147**

**Keywords: Reproductive behavior, mares, fertility**