

## Veterinaria México

Volumen 35  
Volume

Número 1  
Number

Enero-Marzo 2004  
January-March

*Artículo:*

Desarrollo folicular, concentraciones de FSH, estradiol y MPOGF2 asociado con persistencia lútea inducida por la administración de líquido folicular equino libre de esteroides en la oveja

Derechos reservados, Copyright © 2004:  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Otras secciones de  
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in  
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*



Medigraphic.com

# **Desarrollo folicular, concentraciones de FSH, estradiol y MPGF2 asociado con persistencia lútea inducida por la administración de líquido folicular equino libre de esteroides en la oveja**

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

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

---

### **Abstract**

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

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

### **Resumen**

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

---

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

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

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

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

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

## Introduction

In the ewe the oestrous cycle length is closely related to the luteal phase length, and particularly to the moment in which the pulsatile pattern of prostaglandin F2 (PGF2 $\alpha$ ) secretion is established, resulting in CL regression<sup>1</sup>. PGF2 $\alpha$  secretion is regulated by complex interactions between the CL, ovarian follicles and the uterus. An initial exposure to progesterone during 10 to 12 days is needed before estradiol receptors can appear in the endometrium. Once this has occurred estradiol produced by the dominant follicles stimulates the synthesis of oxytocin receptors in the endometrium so that oxytocin can now act in the uterus to induce the release of PGF2 $\alpha$ .

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

The suppression of the estradiol source through the physical elimination of ovarian follicles has resulted in delayed CL regression in the ewe<sup>7,8</sup> and the cow<sup>9</sup>. A more practical alternative could be the suppression of follicular development through the

## Introducción

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

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

administration of a rich source of inhibin<sup>10</sup>. This hormone inhibits FSH secretion at pituitary level<sup>11,12</sup>, thus resulting in the suppression of follicular growth and estradiol production<sup>13,14,15</sup>. Inhibin is found in high concentrations in equine follicular fluid<sup>16</sup>. In mares, administration of equine follicular fluid that was previously treated to remove steroid hormones<sup>17</sup> caused a marked suppression of FSH secretion and follicular growth. Hernández et al.<sup>18</sup> were able to significantly reduce the FSH concentration in ewes that received steroid-free equine follicular fluid (EFF).

If EFF is capable of reducing follicular estrogen production in diestrous ewes, it could avoid the establishment of the pulsatile pattern of PGF<sub>2</sub> $\alpha$  secretion that is needed to induce CL regression, and this would lengthen the luteal phase.

The objective of this work was to evaluate the effect of EFF administration during diestrus on the secretion of FSH, follicular development, estradiol concentrations, MPGF<sub>2</sub> $\alpha$  secretion and luteal phase length in the ewe.

## Material and methods

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

### **Preparation of the equine follicular fluid**

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

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

### **Experimental design**

Forty-one adult Hampshire and Suffolk ewes were used. They all had at least two previous oestrous cycles before the beginning of the experiment. The ewes were synchronized by the insertion of an intravaginal sponge impregnated with 45 mg of flurogesterone acetate (Chronogest, Intervet, Mexico). Sponges were retrieved 12 days after their insertion, and 2 days

La supresión de la fuente de estradiol mediante la eliminación física de los folículos ováricos retrasa la regresión del cuerpo lúteo tanto en ovejas<sup>7,8</sup> como en vacas.<sup>9</sup> Una alternativa práctica para retrasar el inicio de la luteolisis en rumiantes es suprimir el desarrollo folicular mediante la administración de una fuente rica en inhibina.<sup>10</sup> Esta hormona inhibe la secreción de la hormona folículo-estimulante (FSH) a nivel hipofisiario,<sup>11,12</sup> ello resulta en la supresión del crecimiento folicular y la producción de estradiol.<sup>13-15</sup> La inhibina se encuentra en concentraciones elevadas en el líquido folicular equino;<sup>16</sup> en yeguas se suprimió la secreción de FSH y el crecimiento folicular al administrar líquido folicular previamente tratado para remover las hormonas esteroides (LFE).<sup>17</sup> En ovejas, Hernández et al.<sup>18</sup> suprimieron las concentraciones de FSH al recibir LFE, lo que permite utilizarlo en esta especie como fuente biológicamente activa de inhibina.

La capacidad del LFE para reducir la producción folicular de estrógenos en la oveja diéstrica, evita el establecimiento del patrón de secreción pulsátil de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  necesario para inducir la regresión del cuerpo lúteo, ello propiciaría alargamiento de la fase lútea.

Aquí se evalúa el efecto de la administración de líquido folicular equino libre de esteroides sobre la secreción de FSH, desarrollo folicular, concentraciones de estradiol, secreción de MPGF<sub>2</sub> $\alpha$  y la longitud de la fase lútea de ovejas diéstricas .

## Material y métodos

Este trabajo se realizó en una granja experimental cerca de la ciudad de México. El clima es de tipo c(w) (w)b (ij), que corresponde a semifrío-semihúmedo, con lluvias en verano y precipitación anual de 800 a 1 200 mm. El experimento se realizó en septiembre y octubre, en plena época reproductiva de ovinos.<sup>20</sup>

### **Preparación del líquido folicular equino**

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

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

### **Diseño experimental**

Se utilizaron 41 ovejas adultas de las razas Hampshire

prior to removing the sponges the animals were intramuscularly injected with 15 mg of PGF<sub>2</sub>α (Lutalyse, Upjohn, Mexico). Detection of oestrus was done twice a day using a male fitted with an apron. The onset of oestrus was considered as day 0 of the cycle. On day 11 after the synchronized oestrus, two groups were formed at random: EFF (n=24) and control (n=17).

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

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

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

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

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

The onset of the luteal phase was considered when progesterone concentrations increased above 1 ng/ml, and its end when they declined to less than 1 ng/ml (1). The number of PGF<sub>2</sub>α pulses and the interval between them was calculated according to the method described by Zarco et al.,<sup>24</sup>.

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

## Results

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

All results are expressed as mean standard error. FSH concentrations between days 12 and 16 were significantly lower ( $P < 0.05$ ) in the ewes treated with EFF than in the control ones (Figure 1). Both the average diameter of the ovarian follicles and the estradiol

and Suffolk que habían presentado dos estros previos al inicio del experimento. Las ovejas se sincronizaron mediante la inserción de una esponja intravaginal impregnada con 45 mg de acetato de fluorogestona.\* Las esponjas se retiraron 12 días después de la inserción, dos días antes de remover las esponjas se inyectaron 15 mg de PGF<sub>2</sub>α\*\* por vía intramuscular. La detección de estros se realizó dos veces al día utilizando un macho con mandil. El inicio del estro se consideró como el día cero del ciclo; el día 11, subsecuente al estro sincronizado, se formaron aleatoriamente dos grupos: LFE (n = 24) y testigo (n = 17).

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

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

En las muestras de dos ovejas del grupo LFE en las que fue evidente un retraso en la luteolisis y en dos ovejas del grupo testigo donde se observó una fase lútea de duración normal, se determinaron las concentraciones del metabolito de la PGF<sub>2</sub>α (15-ceto-13,14 dihidro PGF<sub>2</sub>α.<sup>22</sup>

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

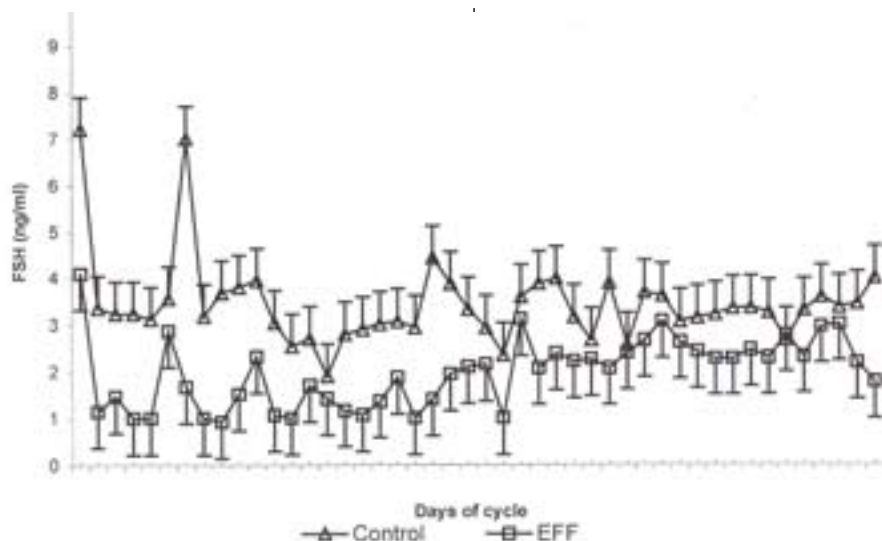
El día 14 del ciclo, ocho ovejas del grupo tratado y siete del testigo fueron ovariectomizadas. En los ovarios así obtenidos se contaron y midieron los folículos visibles, posteriormente se aspiró el líquido de los folículos más grandes. El líquido de los folículos aspirados se diluyó (1:50) con solución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

Cuando las concentraciones de progesterona superaron 1 ng/ml se inició la fase lútea, que terminó al reducirse a menos de 1 ng/ml. Se calcularon las pulsaciones de PGF<sub>2</sub>α y el intervalo entre ellas, según el método de Zarco et al.<sup>24</sup>

Las concentraciones de progesterona y FSH se compararon mediante análisis de varianza para

\*Chronogest, Intervet, México.

\*\*Lutalyse, Upjohn, México.



concentration in the follicular fluid were significantly lower ( $P < 0.05$ ) in the ewes of the treated group ( $2.62 \pm 0.14$  mm;  $4.35 \pm 2.3$  ng/ml), than in those of the control group ( $3.42 \pm 0.20$  mm;  $34.8 \pm 12.15$  ng/ml).

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

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

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

mediciones repetidas. La duración de la fase lútea, la concentración de estradiol folicular y el tamaño folicular se compararon entre grupos mediante una prueba de "t" de Student.

### **Resultados**

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

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

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

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

En las cuatro ovejas en las que se determinaron las concentraciones del metabolito de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  se

**Cuadro 1**

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

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

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

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

## Discussion

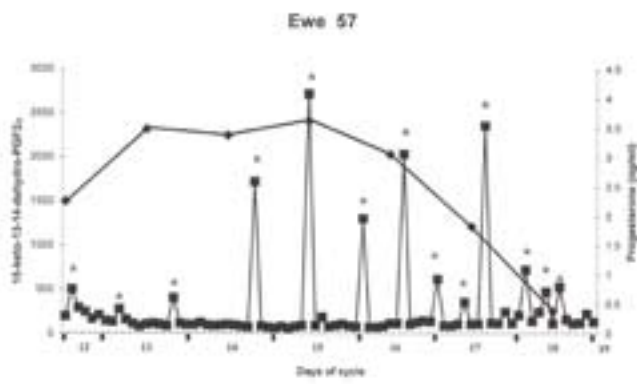
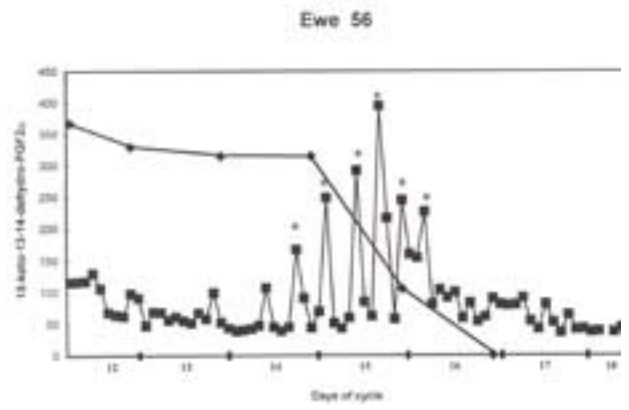
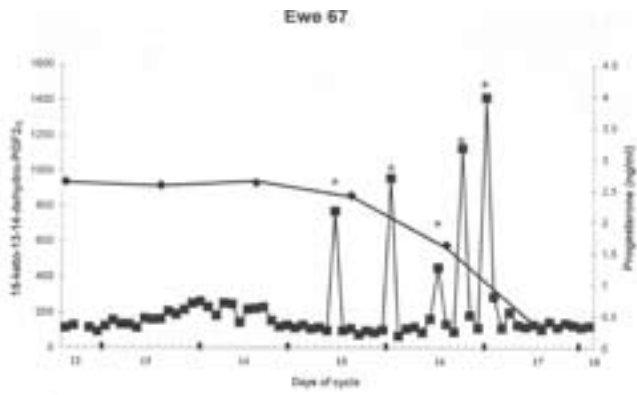
The treatment with EFF caused a significant reduction in FSH concentrations (Figure 1) that was associated with a reduction in follicle development; confirming observations of previous studies using equine follicular fluid<sup>18</sup> as well as bovine follicular fluid (BFF)<sup>1,15,25</sup>. Likewise,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

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

observó un patrón de secreción pulsátil. En las ovejas del grupo testigo (ovejas 67 y 56) se presentaron cinco pulsos de PGF2 $\alpha$  durante los días 15 y 17 del ciclo, con intervalo entre pulsos de  $8 \pm 3.2$  h (Figuras 2 y 3), lo que se asoció con la regresión del cuerpo lúteo. Una oveja tratada con LFE (número 57) presentó cinco pulsos con un intervalo entre pulsos de  $14 \pm 2.3$  h entre los días 14 y 17 (Figura 4); mientras que la otra oveja tratada con LFE (número 1 231) tuvo cuatro pulsos entre los días 14-20, con intervalo entre ellos de  $22 \pm 12$  h (Figura 5). Posteriormente en ambas ovejas se aceleró la secreción de PGF2 $\alpha$ , lo que coincidió con la regresión del cuerpo lúteo el día 21 del ciclo en la oveja número 1 231 y el día 18 en la oveja número 57.

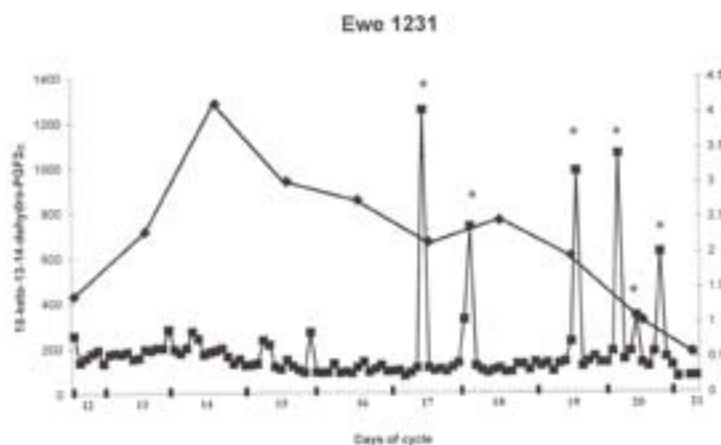
## Discusión

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



ic.com





The results of the present study suggest that the mechanism by which the reduction in estradiol concentrations lengthens the luteal phase is through the interference with the establishment of the pulsatile pattern of PGF2 $\alpha$  secretion that is required to cause luteolysis.<sup>1</sup> Thus, one ewe (No. 57) treated with EFF presented 5 pulses between days 14 to 17 at 14  $\pm$  2.3 h, intervals, whereas the other EFF ewe (No. 1231) had 4 pulses from day 14 to 20 at 22  $\pm$  12 h, intervals. Corpus luteum regression in the ewes treated with EFF only took place when the frequency of PGF2 $\alpha$  secretion was increased. In contrast, the ewes in the control group presented 5 PGF2 $\alpha$  pulses between days 15 and 17 of the cycle, with an interval between pulses of 8  $\pm$  3.2 h, which was associated with luteolysis. These observations coincide with those of Zarco et al.<sup>1</sup> who noticed that, in order for luteolysis to take place, it is necessary that pulses occur with a frequency of one pulse every 8 h. The same group also observed that a reduction in the frequency of PGF2 $\alpha$  is associated with the luteolytic failure of ewes with spontaneous persistence of the CL, in which the average interpulse interval was about 16 h<sup>24</sup>. The results of the present study suggest that the delay of CL regression caused by follicular suppression is related to a failure in the establishment of a luteolytic pattern of PGF2 $\alpha$  secretion and not to the total suppression of PGF2 $\alpha$  production.

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

Las ovejas tratadas con LFE tuvieron una fase lútea de mayor duración que las ovejas testigo, ello indica que la supresión del desarrollo folicular mediante el tratamiento con LFE permite retrasar la luteolisis. Estos resultados coinciden con lo observado por Miquelajauregui,<sup>26</sup> quien utilizó líquido folicular de origen bovino para provocar el mismo efecto. Además, previamente se ha logrado evitar la regresión prematura del cuerpo lúteo mediante la administración de LFB<sup>10</sup> o LFE<sup>27</sup> en ovejas inducidas a ciclar durante la época de anestro. Beard y Hunter<sup>10</sup> propusieron que este efecto se debe a la supresión de las concentraciones circulantes de estradiol, esto es apoyado por los trabajos en los que se eliminan físicamente los folículos ováricos en ovejas,<sup>7,8</sup> y con los efectuados con vacas en las que se eliminan los folículos o se suprime su desarrollo.<sup>9,28</sup>

Los resultados de este estudio sugieren que el mecanismo mediante el cual la reducción en las concentraciones de estradiol favorece la prolongación de la fase lútea se efectúa a través de la interferencia con el patrón de secreción pulsátil requerido para que la luteolisis se realice.<sup>1</sup> Así, en una oveja tratada con LFE (número 57) se presentaron cinco pulsos entre los días 14 y 17 con un intervalo de 14  $\pm$  2.3 h, mientras que la otra oveja tratada con LFE (número 1231) tuvo cuatro pulsos entre los días 14-20, con intervalo de 22  $\pm$  12 h. La regresión del cuerpo lúteo en las ovejas tratadas con LFE sólo ocurrió cuando la frecuencia de secreción de PGF2 $\alpha$  se incrementó. Estos resultados contrastan con lo observado en las ovejas del grupo testigo, que presentaron cinco pulsos durante los días 15 y 17 del ciclo, con intervalo entre pulsos de 8  $\pm$  3.2 h, lo que se asoció con la ocurrencia de la luteolisis. Estas observaciones coinciden con lo encontrado por Zarco et al.,<sup>1</sup> quienes observaron que para que se efectúe la luteólisis se necesita que

the recycling of oxytocin receptors, rather than to be an absolute requirement for their synthesis<sup>29</sup>.

In the present study, although luteal regression was prolonged in the treated ewes, the average delay in luteolysis was only slightly longer than 1 day, after which CL regression took place. The same happened when Miquelajauregui<sup>26</sup> used bovine follicular fluid during diestrus. This aspect is particularly interesting, as the same EFF treatment in ewes with short luteal phases avoids premature regression<sup>27</sup>, lengthening the luteal phase 7 or 8 days more than in the non-treated ewes. This difference between the treatment during the diestrus of normal cycles and that during short cycles can be due to the length of progesterone exposure, since after 10 to 12 days of exposure to this hormone the uterus starts producing PGF<sub>2</sub>α even in ovariectomized ewes<sup>30</sup>, i.e., without being exposed to estradiol. Then, it is possible that in spite of the achieved estradiol suppression with the EFF treatment, the length of exposure to progesterone finally determined the establishment of the pulsatile secretion of PGF<sub>2</sub>α which was evident on days 14-15 when ewes treated with EFF and the control ones started to produce PGF<sub>2</sub>α pulses. Also in the study of Balcázar<sup>27</sup> regression of the corpus luteum occurred on days 14 or 15 of the cycle, even when the animals were still receiving EFF in that moment.

It is concluded that the treatment with EFF reduced FSH secretion, which resulted in the presence of smaller ovarian follicles with lower estradiol concentrations, lengthening the luteal phase probably due to a modification in the pattern of PGF<sub>2</sub>α secretion.

## References

1. Stephano HA, Ramírez TC, Gay GM, Maqueda JJ. Estudios de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. Memorias del XVII Congreso de la Asociación de Médico Veterinarios Especialistas en Cerdos; 1981, Puerto Vallarta, México. 1981:43.
2. Stephano A, Gay G, Ramírez T. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associate with a paramixovirus infection. *Vet Rec* 1988;122: 6-10.
3. Moreno-López J, Correa-Girón P, Martínez A, Ericsson A. Characterization of a paramixovirus isolated from the brain of a piglet in México. *Arch Virol* 1986;91:221-231.
4. Stephano A. Blue eye diseases. In: Leman AD, Straw BF, Mengeling WL, Allaire AD, Taylor DJ, editors. *Porcine Diseases*. Ames, Ia: Iowa State University press, 1994:237-241.
5. Hernández J, Ramírez H, Zenteno R, Monrroy J, Reyes-Leyva J, Zenteno E. Neumonitis inducida por el rubulavirus porcino. *Rev Inst Nac Enferm Resp* 1997;10:250-255.
6. Ramírez-Mendoza H, Hernández-Jaúregui P, Reyes-Leyva J, Zenteno E, Moreno-López J, Kennedy S.

los pulsos ocurran con frecuencia de un pulso cada 8 h. En contraste, una disminución en la frecuencia de secreción de PGF<sub>2</sub>α provoca falla en la luteolisis, como sucede en las ovejas que presentan persistencia espontánea del cuerpo lúteo, en las que se observó un pulso cada 16 h.<sup>24</sup> Los resultados del presente trabajo sugieren que el retraso de la regresión del cuerpo lúteo cuando se eliminan los folículos ováricos obedecería más que a un retraso en la secreción de PGF<sub>2</sub>α, a una falla en el establecimiento de un patrón luteolítico de secreción de esta hormona.

La modificación de la frecuencia de los pulsos observada en este trabajo es similar a la encontrada por Zhang et al.,<sup>29</sup> quienes suprimieron las concentraciones de estradiol mediante irradiación de los folículos ováricos y vieron que la secreción de PGF<sub>2</sub>α no se evitaba, pero el intervalo entre pulsos se alargaba, retrasando de esta forma la regresión del cuerpo lúteo. Lo anterior confirma que el papel del estradiol en la síntesis de receptores a oxitocina durante el establecimiento de la secreción pulsátil de PGF<sub>2</sub>α puede ser un papel facilitador del reciclaje de receptores de oxitocina más que un requerimiento absoluto para su síntesis.<sup>29</sup>

No obstante que en el presente trabajo las ovejas tratadas tuvieron una fase lútea más larga, esta prolongación fue apenas de un poco más de un día, en promedio. Algo similar ocurrió cuando Miquelajauregui<sup>26</sup> utilizó LFB durante el diestro. Esta situación resulta interesante, ya que el mismo tratamiento en ovejas con fases lúteas cortas evita la regresión prematura<sup>27</sup> y prolonga la fase lútea durante siete u ocho días más que en las ovejas no tratadas. Esta diferencia puede obedecer al tiempo de exposición a progesterona, ya que después de diez a 12 días de exposición a esta hormona, el útero comienza a secretar PGF<sub>2</sub>α aun en ovejas ovariectomizadas;<sup>30</sup> es decir, sin necesidad de ser expuesto a estradiol. Entonces, es posible que a pesar de la supresión de la concentración de estradiol lograda con el tratamiento con LFE, la duración de la exposición a progesterona haya determinado el establecimiento de la secreción pulsátil de PGF<sub>2</sub>α, ya que fue evidente que en los días 14-15 del ciclo tanto las ovejas tratadas con LFE como las testigo comenzaron a liberar pulsos de PGF<sub>2</sub>α. También en el trabajo de Balcázar<sup>27</sup> la regresión del cuerpo lúteo ocurrió los días 14 o 15 del ciclo, a pesar de que los animales continuaban recibiendo LFE en ese momento.

Se concluye que el tratamiento con LFE redujo la secreción de FSH, lo que explica la presencia de folículos ováricos de menor tamaño, con menores concentraciones de estradiol y con alargamiento de la fase lútea, posiblemente debido a una modificación del patrón de secreción de la PGF<sub>2</sub>α.

- Lesions in the reproductive tract of boars experimental infected with porcine rubulavirus. *J Comp Pathol* 1997;117:237-252.
7. Ramírez-Mendoza H. Fisiopatología del paramixovirus del Ojo Azul a nivel testicular. (tesis de doctorado). México (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2000.
  8. Allan GM, MacNeilly F, Walker Y, Linné T, Moreno-López J, Hernández P, et al. A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Diagn Invest* 1996;8:405-413.
  9. MacNeilly F, Walker I, Allan G, Foster C, Linné T, Merza M, et al. A comparative study on the use of virus and antibody detection techniques for the diagnosis of La Piedad Michoacán paramyxovirus (LPMV) infection in pigs. *J Vet Diagn Invest*, 1997; 9: 3-9.
  10. Espinosa S. Evaluación de semen de verracos inoculados con el virus de la enfermedad del Ojo Azul (tesis de maestría). México (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2001.
  11. Rima B, Alexander BJ, Billeter MA, Collins PL, Kingsbury DW, Lipkind MA, et al. Family Paramyxoviridae, In: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Matelli GP, et al., editors. *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses*. New York: Springer-Verlag, 1995:265-274.
  12. Sundqvist A, Berg M, Moreno-López J, Linné T. The hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxovirus revealed the closest relationship to simian virus 5 and mumps virus. *Arch Virol* 1991;122:331-278.
  13. Berg M, Sundqvist A, Moreno-López J, Linné T. Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix protein gene: comparative sequence analysis with other paramyxoviruses. *J Gen Virol* 1991;72:1045-1050.
  14. Berg M, Hjertner B, Moreno-López J, Linné T. The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polipeptides, P, V, and C; the P protein mRNA is edited. *J Gen Virol* 1992;73:1195-1200.
  15. Berg M, Bergvall AC, Svenda M, Sundqvist A, Moreno-López J, Linné T. Analysis of the fusion protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: comparative analysis of paramyxoviruses F proteins. *Virus Genes* 1997;14:55-61.
  16. Wolinsky JS. Mumps. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields in Virology*. Philadelphia-Nueva York: Lippincott-Raven Publishers, 1996:1243-1266.
  17. Hernández J, Ramírez H, Carreón R, Mercado C, Lascuraín R, Hernández-Jaúregui P, et al. Several isolates of the Porcine Paramyxovirus can be sorted into two groups with different behavior. *Memorias del III Congreso Internacional de Virología Veterinaria*. Interlaken, Suiza. 1994:P1-6
  18. Sundqvist A, Berg M, Hernández-Jaúregui P, Linné T, and Moreno-López J. The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *J Gen Virol* 1990;71:609-613.
  19. Reyes-Leyva J, Hernández-Jaúregui P, Montaña L, Zenteno E. The porcine paramyxovirus LPMV specifically recognize sialil (2-3) lactose-containing structures. *Arch Virol* 1993;133:195-200.
  20. Espinosa B, Reyes J, Hernández-Jaúregui P, Zenteno R, Ramírez H, Hernández J, et al. Carbohydrate specificity and porcine rubulavirus infectivity. In: Morilla A, Zimmerman J, Ion K, editors. *Trends in Viral Emerging Diseases of Porcine*. Ames, Ia: Iowa State University Press, 2002:81-85.
  21. Reyes-Leyva J, Espinosa B, Hernández J, Zenteno R, Vallejo V, Hernández-Jaúregui P, et al. E. NeuAca-2,3Gal-glycoconjugate expression determinates cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. *Com Biochem Physiol* 1997;118B:237-332.
  22. Vallejo V, Reyes-Leyva J, Hernández J, Ramírez H, Delannoy P, Zenteno E. Differential expression of sialic acid on porcine organs during the maturation process. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol* 2000;126:415-424.
  23. Hernández J, Reyes-Leyva J, Zenteno R, Ramírez H, Hernández-Jaúregui P, and Zenteno E. Immunity to porcine rubulavirus infection in adult porcine. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;64:367-381.
  24. Hernández-Jaúregui P, Sundqvist A, Fuentes M, Díaz A, Reyes-Leyva J, Hernández E, Moreno-López J. Correlación entre las pruebas de virus neutralización, inhibición de la hemoaglutinación y ELISA en sueros vacunales y de brote para anticuerpos contra el Paramixovirus del Síndrome del Ojo Azul en cerdos. *Vet Mex* 1992;23:217-222.
  25. Zenteno R. Purificación y predicción de determinantes antigénicos y de estructura secundaria en la hemaglutinina-neuraminidasa del paramixovirus porcino de La Piedad Michoacán. (tesis de maestría). México (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1997.
  26. Ray R, Compans RW. Paramyxoviruses. In: Van Regenmortel MHB, Neurath AR editors. *Immunochemistry of viruses II. The basis for serodiagnosis and vaccines*. New York: Elsevier, 1990: 217-236.
  27. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. 4 ed. Philadelphia Pennsylvania, W.B. Saunders, 2000.
  28. Griffith D, Ward B, Esolen L. Pathogenesis of measles virus infection: a hypothesis for altered immune response. *J Infect Dis* 1994;170:S24-31.
  29. Griffith D, Bellini W. Measles Virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields in Virology*. Philadelphia. New York: Lippincott-Raven Publishers, 1996:1267-1312.
  30. Fujinami RS, and Oldstone MBA. Alterations in expression of measles virus polypeptides by antibody: molecular events in antibody induced antigenic modulation. *J Immunol* 1980;125:78-85.
  31. Hjertner B, Wiman AC, Svenda M, Berg M, Moreno-

- Lopez J, Linne T. Multiple factors including subgenomic RNAs and reduced viral protein expression are associated with a persistent infection by porcine rubulavirus (LPMV). *Arch Virol* 1998;143:425-39.
32. Wiman AC, Hjertner B, Linné T, Herron B, Allan G, McNeilly F, et al. Porcine rubulavirus LPMV RNA persists in the central nervous system of pigs after recovery from acute infection. *J Neurovirol* 1998;4:545-52.
  33. Hjertner B, Linné T, Moreno-López J. Establishment and characterization of a porcine rubulavirus (LPMV) persistent infection in porcine kidney cells. *Acta Vet Scand* 1997;38:213-24.
  34. Kasel JA, Frank AL, Keitel WA, Taber LH, Glezen WP. Acquisition of serum antibodies to specific viral glycoproteins of parainfluenza virus 3 in children. *J Virol* 1984;52:828-32.
  35. Reyes-Leyva J, Espinosa B, Santos G, Zenteno R, Hernández J, Vallejo V, et al. Purification and characterization of the hemagglutinin-neuraminidase of porcine rubulavirus LPMV. *Glycoconj J* 1999;16:517-522.
  36. Zenteno R, Hernández J, Espinosa B, Hernández-Jaúregui P, Reyes J, Zenteno E. Secondary structure prediction of the hemagglutinin neuraminidase from a porcine rubulavirus. *Arch Virol* 1998;143:333-352.
  37. Pescovitz M.D, Lunney J K, Sachs DH. Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J Immunol* 1984;133:368-373.
  38. Yang H, Parkhouse RM. Phenotypic classification of porcine lymphocytes sub-populations in blood and lymphoid tissues. *Immunology* 1996;89:76-83.
  39. Saalmueller A, Redheads M J, Buhning H J, Jonjic S, Koszinowski UH. Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1987;17:1297-1302.
  40. Pescovitz MD, Sakapoulos AG, Gaddy JA, Husman RJ, Zuckermann FA. Porcine peripheral blood CD4+/CD8+ dual expressing T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1994;43:53-62.
  41. Zuckermann FA. Extrathymic CD4/CD8 double-positive T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;72:55-66.
  42. Ward BJ, Johnson RT, Vaisberg A, Jaúregui E, Griffin DE. Cytokine production in vitro and the lymphoproliferative defect of natural measles virus infection. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;61:236-48.
  43. Drew T. A review of evidence for immunosuppression due to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet Rec* 2000;31:27-39.
  44. Zuckermann F, Husmann RJ. Functional and phenotypic analysis of the peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. *Immunology* 1996;87:500-512.
  45. Ivanoska D, Cuperlovic K, Lunney JK. Peripheral blood mononuclear cells subsets during *Trichinella spiralis* infection in pigs. *Res Vet Sci* 1990;49:92-97.
  46. Hernández J, Garfias Y, Nieto A, Mercado C, Montaño L, Zenteno E. Comparative evaluation of the CD4+CD8+ and CD4+CD8- lymphocytes in the immune response to porcine rubulavirus. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;79:249-259.
  47. Summerfield A, Rhiza H, Saalmueller A. Functional characterization of porcine CD+4CD8+ extrathymic T lymphocytes. *Cell Immunol* 1996;168:291-296.
  48. Murail-Krishna K, Altman JD, Sures M, Sourdive DJD, Zajac AJ, Miller JD, et al. Counting antigen-specific CD8 T cells: a re-evaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 1998;8:177-187.
  49. Rodríguez-Ropon A, Hernández-Jaúregui P, Sánchez-Torres L, Favila-Castillo L, Estrada-Parra S, Moreno-Lopez J, et al. Apoptosis in lymph nodes and changes in lymphocyte subpopulations in peripheral blood of pigs infected with porcine rubulavirus. *J Comp Pathol* 2003;128:1:8.
  50. Tripp RA, Hou S, McMickle A, Houston J, Doherty PC. Recruitment and proliferation of CD8+ T cells in respiratory virus infections. *J Immunol* 1995;154:6013-6021.
  51. Page G, Wang F, Hahn E. Interaction of pseudorabies virus with porcine peripheral blood lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1992;52:441-48.
  52. Bradley RW, Swain LM. T cell memory. *Annu Rev Immunol* 1998;16:201-223.
  53. Galvan M, Murali-Krishna K, Lua L, Baum L, Ahmed R. Alterations in cell surface carbohydrates on T cells from virally infected mice can distinguish effector-memory CD8+ T cells from naïve cells. *J Immunol* 1998;161:641-648.
  54. Lascurain R, Porras F, Baez R, Chavez R, Martínez-Cairo S, Alvarez G, et al. *Amaranthus leucocarpus* recognizes human naïve T cell subpopulations. *Immunol Invest* 1997;26:579-587.
  55. Hernández J, Garfias Y, Reyes-Leyva J, Chávez R, Lascurain R, Zenteno E. Peanut and *Amaranthus leucocarpus* lectins discriminate between memory and naïve/quiescent porcine lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 84 2002;84:71-82.
  56. Ober BT, Summerfield A, Mattlinger C, Weismuller KH, Jung G, Pfaff E, et al. Vaccine-induced, pseudorabies virus-specific, extrathymic CD4+CD8+ memory T-helper cells in porcine. *J Virol* 1998;72:4866-4873.
  57. Zinkernagel RM, Bachmann F, Kundis TE, Ochen S, Pirchet H, Hengartner H. On immunological memory. *Annu Rev Immunol* 1996;14:333-368.
  58. Hernández J. Estudio de la respuesta inmune celular y humoral en cerdos infectados experimentalmente con el rubulavirus porcino. (tesis de maestría). México (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1997.
  59. Biron CA. Cytokines in the generation of the immune response to, and resolution of, virus infection. *Curr Opin Immunol* 1994;6:530-538.
  60. Thacker EL. Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2001;17:551-65.

61. Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997;15:297-322.
62. Chen WF, Zlotnik A. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol* 1991;147:528-536.
63. Springgs MK. One step ahead of the game: viral immunomodulatory molecules. *Ann Rev Immunol* 1996;14:101-30.
64. Foy TM, Aruffo A, Bojorath J, Buhlmann JE, Noelle RJ. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol* 1996;14:591-617.

