

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**COMPARACIÓN ENTRE ACETATO DE HISTRELINA Y GONADOTROFINA
CORIÓNICA HUMANA (HCG) COMO INDUCTORES DE LA OVULACIÓN
EN YEGUAS (EQUUS CABALLUS)**

por

**Sthefanía ICATT GARANDÁN
Natalia JORGE COLMÁN**

TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el
título de Doctor en Ciencias
Veterinarias

Orientación: OPA sur

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2022**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Dr. Rodrigo Mattos

Segundo miembro (Tutor):



Dr. Nicolás Cazales

Tercer miembro:



Dra. María José Estradé

Cuarto miembro (Co-tutor)



Dra. Florencia Pereyra

Fecha:

02 / 12 / 2022

Autores:



Sthefanía Icatt Garandán



Natalia Jorge Colmán

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecerle a la Facultad de Veterinaria por brindarnos la formación como profesionales y ser nuestro segundo hogar por tanto tiempo.

A nuestro tutor Nicolás Cazales por elaborar este proyecto tan lindo y tenernos en cuenta para formar parte de él, abriéndonos las puertas del Centro Equus, guiándonos con tanta pasión y compromiso a lo largo de este camino.

A nuestra co-tutora Florencia Pereyra “florchu”, por aguantarnos y estar siempre para cada consulta, brindándonos toda su experiencia y conocimiento de eso que tanto ama.

A quienes colaboraron en el trabajo de campo, al personal del Centro Equus, Jorge Estévez y a Johnny por la disposición y la paciencia para ayudar siempre.

Agradecemos a los funcionarios de Biblioteca, quienes nos ayudaron en la búsqueda de material bibliográfico.

Por último, agradecer a nuestras familias y amigos por acompañarnos en esta dura etapa de nuestras vidas, festejando nuestras alegrías y acompañando en nuestras tristezas, no dejándonos bajar los brazos nunca.

Agradecimientos de Sthefanía Icatt

Quiero agradecer en primer lugar a mi familia "los tuyos, los míos y los nuestros", por el apoyo incondicional, por no dejarme caer, por entender mis ausencias cada vez que como dijera mi hermana "me cuchusaba a estudiar" y por enseñarme de amor, de respeto y de unión estando siempre todos juntos por y para mí. A mis "tatas" por ser lo mejor de este mundo, por ser mi lugar seguro siempre.

A mi esposo Nicolás, por atajarme cuando tropecé y no dejar que jamás me diera por vencida, por impulsarme a superarme día a día y ayudarme a ser mejor profesional y mejor persona.

A mis suegros y cuñados, mis "hermanitos y viejitos" por festejar mis logros, por estar incondicionalmente y ser ese pilar fundamental para mí.

A mis amigos de la vida y de Fvet sin los que no hubiera podido lograr esta meta, son todo lo que está bien.

A mi amiga y compañera de tesis, "la negri" gracias por seguirme en todas, por hacer que las horas interminables que le dedicamos a este proyecto fueran alegres, llevaderas y con mucho ritmo.

Agradecimientos de Natalia Jorge

Agradecer a mi familia que me apoyó, motivó y creyó en todo momento; este logro es por y para ellos.

A mis amigos de siempre y a los que la Facultad me cruzó, que estuvieron presentes apoyando y dando fuerzas.

A todas las personas que se cruzaron en mi camino y me brindaron su apoyo para continuar.

Y por último, a "la negri", compañera de tesis y de mil batallas, gran artífice de haber llegado hasta acá.

Tabla de contenidos

1. RESUMEN	10
2. SUMMARY	12
1 INTRODUCCIÓN	13
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 RECORDATORIO ANATÓMICO: OVARIOS	17
2.2 INFLUENCIA DE LA ESTACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD OVÁRICA.	17
2.3 COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO	20
2.3.1 Anestro estacional	20
2.3.2 Transición de primavera	20
2.3.3 Temporada reproductiva	21
2.3.4 Transición de otoño	22
2.4 FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LA YEGUA: CICLO ESTRAL	22
2.4.1 Estro	23
2.4.2 Diestro	24
2.5 DESARROLLO FOLICULAR	24
2.5.1 Folículo ovárico	24
2.5.2 Ovogénesis y Foliculogénesis	25
2.5.3 Dinámica folicular	28
2.6 OVULACIÓN	31
2.7 LUTEOGÉNESIS	33
2.8 LUTEÓLISIS	34
2.9 MANEJO REPRODUCTIVO: CONTROL HORMONAL DEL CICLO ESTRAL	36
3.0 CONTROL HORMONAL APLICADO A Y SU USO EN BIOTECNOLOGIAS DE LA REPRODUCCIÓN	36
3.1 Inseminación artificial (IA)	37
3.2 Transferencia de embriones (TE)	39
4.0 INDUCTORES DE OVULACIÓN	40
4.1 GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA (HCG)	41
4.2 ANÁLOGOS DE GNRH	44

4.2.1 Acetato de Deslorelina.....	46
4.2.2 Acetato de Histrelina.....	48
4.2.3 Otros usos de la GnRH.....	49
4.2.4 Prostaglandina.....	50
5.0 FALLAS EN LA OVULACIÓN/RESPUESTA A INDUCTORES.....	53
6.0 HIPÓTESIS.....	53
7.0 OBJETIVOS.....	54
7.1 OBJETIVO GENERAL.....	54
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
8.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
8.1 Lugar, animales y tiempo.....	54
8.2 Diseño experimental.....	55
8.3 Análisis Estadístico.....	57
9.0 RESULTADOS.....	57
10. DISCUSIÓN.....	62
11. CONCLUSIÓN.....	67
12. CONSIDERACIONES FINALES.....	68
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

Lista de tablas

Tabla 1. Media (\pm EE) de horas de respuesta entre el tratamiento y la ovulación y porcentaje de respuesta entre tratamientos.....	38
Tabla 2. Porcentaje de respuesta (tasa de ovulación) a la hCG por intervalo de tiempo en horas y porcentajes de HAF para las yeguas jóvenes, adultas y viejas.....	39

Tabla 3. Porcentaje de respuesta (tasa de ovulación) a la hCG por intervalo de tiempo en horas y porcentajes de HAF en primavera, verano y otoño	39
Tabla 4. Porcentaje de respuesta (tasa de ovulación) al acetato de histrelina por intervalo de tiempo en horas y porcentajes de HAF en primavera, verano y otoño	39
Tabla 5. Porcentaje de respuesta (tasa de ovulación) al acetato de histrelina por intervalo de tiempo en horas y porcentajes de HAF en primavera, verano y otoño	40
Tabla 6. Porcentaje de respuesta (tasa de ovulación) entre las 24-48 horas entre el acetato de histrelina y la hCG para las yeguas jóvenes, adultas y viejas	40
Tabla 7. Porcentaje de respuesta (tasa de ovulación) entre las 24-48 horas entre el acetato de histrelina y la hCG en primavera, verano y otoño	40
Tabla 8. Incidencia (%) de folículos hemorrágicos anovulatorios (HAF) en relación a la edad de las yeguas	41
Tabla 9. Incidencia (%) de folículos hemorrágicos anovulatorios (HAF) en relación a las estaciones del año	41
Tabla 10. Tasas de preñez (%) para la hCG y para el acetato de histrelina durante las temporadas reproductivas	41
Tabla 11. Tasas de preñez (%) para la hCG y para el acetato de histrelina en las yeguas jóvenes, adultas y viejas y para los meses de primavera, verano y otoño	42
Tabla 12. Relación entre el tamaño del folículo mayor al momento de aplicar la prostaglandina y los días promedio, mínimos y máximos en alcanzar las condiciones de inducción de la ovulación en la yegua	42

Lista de figuras

Figura 1. Versión simplificada de la regulación hormonal del ciclo estral de la yegua.

13

Figura 2. Ciclo estral de la yegua.

16

LISTA DE ABREVIATURAS

AMH	HORMONA ANTI MÜLLERIANA
bFGF	FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO BÁSICO
BMP	PROTEÍNA MORFOMÉTRICA ÓSEA
CL	CUERPO LÚTEO
E₂	ESTRADIOL
EPE	EXTRACTO DE PITUITARIA EQUINA
FD	FOLÍCULO DOMINANTE
FS	FOLÍCULOS SUBORDINADOS
FSH	HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE
GDF-9	FACTOR DE CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN 9
GH	HORMONA DE CRECIMIENTO
GnRH	HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS
GP	GLÁNDULA PINEAL
Hcg	GONADOTROFINA CORIONICA HUMANA
IA	INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

IGF-1	FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA
IGFBP	PROTEÍNAS DE UNIÓN AL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA
IM	INTRAMUSCULAR
IV	INTRAVENOSA
LH	HORMONA LUTEINIZANTE
P₄	PROGESTERONA
PGF₂α	PROSTAGLANDINA
PKA	PROTEÍNA KINASE A
SO	SUPEROVULACIÓN
TE	TRANSFERENCIA DE EMBRIONES
TGFβ	FACTOR TRANSFORMADOR DE CRECIMIENTO - B
TRA	TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA
UI	UNIDADES INTERNACIONALES
VEGF	FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR

1. RESUMEN

La duración del estro en la especie equina presenta una gran variación, siendo difícil poder predecir el momento de la ovulación mediante palpación y ecografía transrectal. La ovulación ocurre en promedio unas 75 horas luego que el folículo preovulatorio alcanza los 35 mm de diámetro, periodo que puede acortarse a 36-48 horas utilizando inductores de la ovulación. La gonadotropina coriónica humana (hCG) y los análogos de la GnRH como el acetato de deslorelina e histrelina son las hormonas más utilizadas para inducir la ovulación en la yegua. Los inductores mejoran la eficiencia reproductiva y reducen los costos de producción, acortando el período del estro y sincronizando las inseminaciones, disminuyendo costos en transporte, recursos humanos, optimizando las dosis de semen y el uso del padrillo. El objetivo de este estudio fue evaluar y comparar la eficacia de la hCG y el acetato de histrelina en inducir la ovulación en yeguas pertenecientes a un programa comercial de inseminación artificial (IA) y transferencia embrionaria (TE) con semen congelado en la República Oriental del Uruguay. Fueron evaluados 353 ciclos estrales de 125 yeguas, predominantemente de raza árabe, cuarto de milla, criollo y cruza, entre 1,5 y 24 años de edad, peso corporal entre 360 y 600 kg y condición corporal ≥ 3 (1-5) durante cuatro temporadas reproductivas (septiembre a mayo) consecutivas del 2018 a 2022. La evaluación de los ovarios, útero y cérvix fue realizada por palpación y ultrasonografía transrectal (Sonoscape® A5, Shenzhen, China) con un transductor lineal de 5 MHz. La ovulación de las yeguas fue inducida con hCG o acetato de histrelina como parte del manejo reproductivo de la clínica. Los ciclos fueron distribuidos en los siguientes grupos experimentales; G1 (n= 119): 1500 UI IV de hCG (Chorulon®, MSD Animal Health, São Paulo, Brasil) y G2 (n= 234): 250 ug acetato de histrelina IM (Sterilin®, Botupharma, São Paulo, Brasil). Las yeguas fueron

monitorizadas diariamente y el tratamiento iniciado cuando un solo folículo mayor alcanzara entre 35 y 40 mm de diámetro, edema endometrial grado ≥ 3 (0-4) y útero y cérvix compatible con estro. El seguimiento ultrasonográfico fue iniciado 24 horas post-tratamiento y subsecuentemente cada 2 - 6 horas hasta la ovulación. Las diferencias entre los grupos por época del año, edad e intervalo de tiempo entre el tratamiento y la ovulación fueron determinadas utilizando el paquete estadístico SAS v9.4 (Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). Las variables categóricas, fueron comparadas con el test exacto de Fisher o test de Chi-cuadrado de Pearson. Para las variables cuantitativas, se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Los resultados fueron presentados como medias \pm EE. Los valores fueron considerados con diferencias significativas con $p < 0,05$. El promedio del diámetro folicular al momento de la inducción fue $38,3 \pm 0,18$ mm, el porcentaje de ovulación entre las 24 y 48 horas fue mayor para la histrelina (80,2%) que para la hCG (70,6%) ($p = 0,0461$). No hubo diferencias significativas ($p = 0,2414$) en el intervalo de tiempo promedio a la ovulación entre las yeguas que recibieron hCG ($37,22 \pm 3,55$ horas) o histrelina ($39,35 \pm 4,49$). La formación de HAF no se vio influenciada ($p > 0,05$), al igual que las tasas de preñez ($p = 0,977$) por el inductor utilizado. La histrelina fue más efectiva que la hCG en inducir la ovulación en yeguas viejas ($p < 0,0001$) y en las estaciones de verano y otoño ($p = 0,0071$), no encontrándose diferencias en primavera ($p = 0,836$). En conclusión, la histrelina es más eficaz que la hCG para inducir la ovulación en yeguas viejas (>15 años) y al final de la estación reproductiva (verano-otoño).

Palabras Claves: hCG; Histrelina; Inducción de la ovulación; Tasas de preñez; HAF

2. SUMMARY

The duration of estrus in the equine species varies greatly, which makes it difficult to predict the time of ovulation by means of palpation and transrectal ultrasound. Ovulation in mares occurs, on average, about 75 hours after the preovulatory follicle reaches 35 mm in diameter, a period which can be shortened to 36-48 hours using ovulation inducers. Human chorionic gonadotropin (hCG) and GnRH analogs such as deslorelin acetate and histrelin acetate, are the most commonly used hormones to induce ovulation in mares. Ovulation inducers improve reproductive efficiency and reduce production costs, shortening the estrus period and synchronizing inseminations, thereby lowering transportation and human resources costs, optimizing semen doses and use of the stallion. The objective of this study was to evaluate and compare the efficacy on hCG and histrelin acetate in inducing ovulation in mares belonging to a commercial AI and ET program with frozen semen in the República Oriental del Uruguay. 353 estrous cycles of 125 mares, predominantly Arabian, Quarter Mile, Criollo and Crossbreed, between 1.5 and 24 years of age, body weight between 360 and 600 kg, body condition score ≥ 3 (1/5) during four reproductive seasons (September to May) from 2018 to 2022, were used for this study. The evaluation of ovaries, uterus and cervix was performed by means of palpation and transrectal ultrasonography (Sonoscape® A5, Shenzhen, China) with a 5 MHz linear transducer. The ovulation in mares was induced with hCG or histrelin acetate as part of the reproductive management of the clinic. The cycles were distributed into the following experimental groups G1 (n=119): 1500 UI IV of hCG (Chorulon®, MSD Animal Health, São Pablo, Brasil) y G2 (n=234): 250 ug histrelin acetate IM (Sterilin®, Botupharma, São Pablo, Brasil). Mares were monitored daily and the treatment initiated when a single major follicle reached 35 and 40 mm in diameter, endometrial

edema grade ≥ 3 (0-4) and uterus and cervix compatible with estrus. Ultrasonographic follow-up was initiated 24 hours post-treatment and subsequently 2-6 hours until ovulation. Differences between groups due to time of the year, age of the mares and time interval between treatment and ovulation, were determined using the commercial software package SAS v9.4 (Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). Categorical variables were compared with Fisher's exact test or Pearson's chi-square test. For quantitative variables the non-parametric Mann-Whitney test was used. The results were presented as means \pm SEM. The values were considered with significant differences with $p < 0, 05$. The mean follicular diameter at the time of induction was $38,3 \pm 0,18$ mm, the percentage of ovulation between 24 and 48 hours was higher for histrelin (83.3%) than for hCG (70.6%) ($p=0.0461$). There was no significant difference ($p = 0.2414$) in the meantime interval to ovulation amongst mares receiving hCG ($37, 22 \pm 3, 55$ hours) or histrelin ($39, 35 \pm 4, 49$ hours). HAF formation was not influenced ($p > 0, 05$), as were pregnancy rates ($p = 0.977$) by the inducer used. Histrelin was more effective ($p < 0, 0001$) than hCG in inducing ovulation in old mares (>15 years) and in summer and autumn seasons ($p = 0, 0071$), with no differences in spring ($p = 0,836$). In conclusion, histrelin is more effective than hCG in inducing ovulation in old mares (>15 years) and at the end of the reproductive season (summer-autumn).

Keywords: hCG; Histrelin; ovulation induction; pregnancy rate; HAF

1 INTRODUCCIÓN

Los equinos fueron introducidos en nuestro país junto con la ganadería y desde entonces se han transformado en un elemento común del paisaje, en herramientas para la producción agropecuaria, industria farmacéutica y co-protagonistas para

diferentes formas de esparcimiento y deporte (Ferrari et al., 2012). En los últimos años, se percibe un mayor dinamismo en las actividades asociadas al caballo, debido a la mejora en las relaciones de precios del agro, al desarrollo del turismo rural-ecuestre y de los deportes ecuestres como la hípica, freno de oro, pruebas morfológicas, funcionales y de adiestramiento, entre otras razones (Ferrari et al., 2012). El stock equino en Uruguay es de aproximadamente 425 mil cabezas, ocupando el puesto 21 del ranking y el segundo puesto en cuanto a la relación caballo por habitantes (Ferrari et al., 2012). La industria equina, genera un valor agregado bruto para la economía uruguaya de casi un punto del PBI, aportando más de U\$S 330 millones de dólares americanos al año, U\$S 29 millones de dólares americanos en exportaciones y en lo que respecta al empleo, se estima que el sector genera anualmente U\$S 106 millones de dólares americanos y 18.000 puestos de trabajo directos, que a su vez, componen núcleos familiares integrados por aproximadamente 67.000 personas, siendo el equino el animal doméstico que más puestos de trabajo genera por animal los 365 días del año (Ferrari et al., 2012).

Para hacer frente a la competencia y al aumento en la demanda de caballos, los productores tienen que capacitarse, aceptar y aplicar métodos científicos, tecnológicos y comerciales similares a los que utilizan otras industrias agropecuarias (Heilenkotter, 2015). El alto valor económico y sentimental que estos representan para los humanos son los que justifican su reproducción hasta la vejez y que se invierta en técnicas de reproducción asistida (TRA) para superar problemas de fertilidad, aumentando así el número de potros nacidos de animales selectos (Benammar et al., 2021). Las TRA nos permiten abordar la infertilidad y sub-fertilidad tanto de la hembra como del macho, de forma muy semejante a lo que ocurre en humanos. Dichas

técnicas van desde: la monta dirigida (bajo seguimiento folicular por ultrasonido), la sincronización del estro, la inducción de la ovulación, la colecta y evaluación del semen (para inseminación artificial (IA) con semen fresco, refrigerado y congelado), la transferencia de embriones (TE), llegando hasta intervenciones más complejas, como la transferencia de gametos (GIFT), la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), clonación y edición génica (Heilenkotter, 2015).

La duración del estro en la especie equina presenta una gran variación, siendo difícil poder predecir el momento de la ovulación mediante palpación y ecografía transrectal. La ovulación en la yegua sin ningún manejo hormonal ocurre en promedio unas 75 horas luego que el folículo preovulatorio alcanza los 35 mm de diámetro dependiendo de la edad, raza y época del año (Farquhar et al., 2002; Silva et al., 2016; Jardim et al., 2020). Este periodo de tiempo puede acortarse en promedio a 36-48 horas con agentes inductores de la ovulación y tener ovulaciones en una ventana de tiempo predecible, y por lo tanto poder cubrir o inseminar la yegua una sola vez lo más cercano posible de la ovulación, aumentando así las chances de preñez. (McCue et al., 2007).

La gonadotropina coriónica humana (hCG) y los análogos de la GnRH como el acetato de deslorelina, histrelina y buserelina son las hormonas más utilizadas para inducir la ovulación en la yegua (McCue et al., 2007). Las principales ventajas clínicas de inducir la ovulación incluyen reducir el periodo del estro, realizar un único servicio por ciclo para padrillos con alta demanda de yeguas, poder programar el transporte de yeguas hacia los padrillos, disminuir el número de montas por ciclo (principalmente en yeguas susceptibles a la endometritis post-servicio), poder realizar inseminaciones artificiales

cercanas a la ovulación tanto para semen refrigerado, congelado o padrillos con baja fertilidad, y poder sincronizar las yeguas donantes con las receptoras en programas de transferencia de embriones. Disminuyendo así gastos en transporte, recursos humanos, optimizando las dosis de semen y el uso de los padrillos (Samper, 2008).

La elección de uno u otro agente inductor de la ovulación va a depender de la disponibilidad en el mercado, costo, eficacia, modo de aplicación, momento del año, edad de la yegua, tamaño folicular, uso previo con éxito o sin éxito en determinada yegua y preferencias del veterinario. La hCG se une a los receptores de LH en el tejido gonadal equino, teniendo un comportamiento o bioactividad de LH causando maduración ovocitaria y desencadenando la ovulación de los folículos dominantes de yeguas en estro (Evans et al., 1982; Voss, 1993). Los agonistas de GnRH, estimulan la liberación endógena de LH y FSH por parte de la pituitaria anterior, estimulando la maduración folicular y la ovulación (Mumford et al, 1995; McCue, 2003). Hasta el momento no existe ningún estudio que evalúe la eficacia de los inductores de la ovulación en las condiciones productivas del Uruguay. Al mismo tiempo, existen pocos trabajos que evalúen la eficacia de la histrelina en inducir la ovulación y el efecto que pueda tener la edad de las yeguas y la estación del año sobre el intervalo de tiempo entre la inducción y ovulación. El objetivo de este estudio es evaluar y comparar la eficacia (porcentaje de respuesta) y precisión (rango en horas de respuesta) de la hCG y el acetato de histrelina en inducir la ovulación en yeguas pertenecientes a un programa comercial de IA y TE con semen congelado equino en la República Oriental del Uruguay.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 RECORDATORIO ANATÓMICO: OVARIOS

La anatomía de los órganos reproductores de la hembra está fuertemente influenciada por la edad, su estado reproductivo actual y su historial previo (Dyce, Sack y Wensing, 2002). Los ovarios realizan funciones exocrinas (gametogénica) y endocrina (producción de hormonas); la función exocrina es quien justifica la existencia de genitales tubulares, permitiendo la integración hormonal de los ovarios y el control del tracto reproductivo (Youngquist y Threlfall, 2007).

En la mayoría de los mamíferos domésticos, los ovarios presentan una zona parenquimatosa periférica (corteza), que contiene varias fases del desarrollo folicular y luteal, la cual rodea a una zona vascular central (médula), compuesta por tejido conectivo rico en vasos sanguíneos (Youngquist y Threlfall, 2007). En cambio, en la yegua, la zona medular rica en vasos sanguíneos, se encuentra rodeando en forma de campana a la corteza del ovario. La corteza solamente alcanza la superficie ovárica a través de la fosa de ovulación (König y Liebich, 2013), siendo este el lugar donde ocurre la liberación de los ovocitos maduros (Dyce et al., 2002), lo cual constituye una característica específica de la yegua (Youngquist y Threlfall, 2007).

2.2 INFLUENCIA DE LA ESTACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD OVÁRICA.

La yegua es poliéstrica estacional de día largo, con actividad sexual cíclica desde la primavera al otoño, por lo que la duración de la exposición a las horas luz es el factor principal que controla la actividad ovárica (Neely, Liu y Hillman, 1989). Los periodos prolongados de horas luz (15 a 16 horas), como sucede en primavera y verano estimulan la actividad ovárica, mientras que los períodos de menos horas luz

(9 a 10 horas) la inhiben (Neely et al.,1989). Dicho patrón es el resultado del ritmo endógeno circanual, el cual está condicionado por factores ambientales externos como el fotoperíodo, la temperatura, nutrición y condición corporal (Nagy, Guillaume y Daels, 2000).

La información sobre cambios que ocurren en el ambiente es transmitida al sistema nervioso central, modificando las funciones hipotalámicas e hipofisarias produciendo así respuestas endocrinas (Ungerfeld, 2011). El estímulo lumínico es captado por la retina, posteriormente pasa al núcleo supraquiasmático del hipotálamo, ganglio cervical superior y glándula pineal (GP) la cual traduce la información neural proveniente del ciclo de luz-oscuridad, en una señal hormonal a través de la melatonina (Neely et al.,1989). La tasa de síntesis o liberación de melatonina está relacionada en forma inversa con la duración de las horas luz, por tanto, el aumento de la exposición a la misma determina la disminución de la liberación de melatonina y el inicio de la ciclicidad (Neely et al.,1989).

La GP y su hormona tienen influencia sobre el hipotálamo, sitio de liberación y producción de GnRH (hormona liberadora de gonadotrofinas). Al disminuir la melatonina, (resultado del aumento en las horas luz) se libera más GnRH, la cual ingresa en el sistema vascular portal y es transportada a la adenohipófisis promoviendo la liberación de LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona folículo estimulante). Ambas entran en la circulación controlando el desarrollo folicular, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (CL) en los ovarios (Neely et al.,1989) (ver figura 1).

La reproducción estacional es una respuesta adaptativa de los animales, concentrando la actividad reproductiva durante la época del año en que las

condiciones medioambientales y de disponibilidad de alimentos son óptimas, asegurándose de esta forma la supervivencia de las crías (Correa y Fernández, 2017). Esto lleva a que se presenten dos períodos específicos, uno de anestro y otro ovulatorio. Entre los meses de ciclicidad y los de anestro, existe el periodo de transición, en donde la yegua presenta actividad ovárica irregular, pero no hay ovulación (Parrado Soler y Fandiño Gomez, 2019).

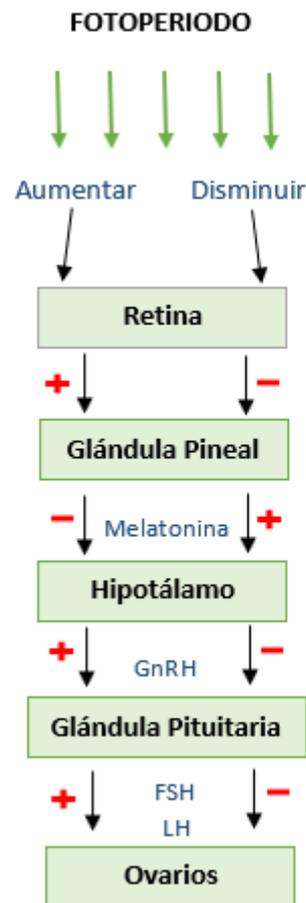


Figura 1. Versión simplificada de la regulación hormonal del ciclo estral de la yegua. El patrón regular del ciclo estral de las yeguas es controlado por la interacción entre la GP, el hipotálamo, la glándula pituitaria y el endometrio. Fuente: extraído y modificado de Brinsko et al., 2011.

2.3 COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO

Como se describió previamente, el ciclo reproductivo anual de la yegua puede dividirse en cuatro fases; anestro de invierno, transición de primavera, temporada de ovulación/ reproducción y transición de otoño (Schnobrich, 2018).

2.3.1 Anestro estacional

Es el momento de completa incompetencia reproductiva (Youngquist y Threlfall, 2007). Está subdividido en anestro profundo y anestro superficial (transición) en base a la actividad folicular presente; caracterizándose al anestro profundo por un desarrollo folicular mínimo (folículos <20 mm de diámetro) (McCue, Logan y Magee, 2007). Está marcado por la disminución en la secreción hipotalámica de GnRH y por ende de LH y FSH hipofisarias. Como resultado, hay una merma en la función ovárica, con un desarrollo folicular y producción hormonal mínima, lo cual se corresponde con una concentración de progesterona (P_4) y estradiol (E_2) prácticamente indetectables (Youngquist y Threlfall, 2007) <1.0 ng/ml y <5 pg/ml respectivamente (McCue et al., 2007). La receptividad sexual está reducida o ausente, los ovarios lisos y firmes y el útero atónico y de paredes delgadas (Duran Graeff, 2007).

2.3.2 Transición de primavera

Esta fase se caracteriza por períodos de estro prolongados, celos divididos e irregulares, que ocurren antes de la primera ovulación, la cual marca el inicio de la estación reproductiva (Neely et al., 1989). En este período, las concentraciones de FSH son óptimas para producir el reclutamiento de folículos, pero al no secretarse LH en cantidad suficiente, no es posible que se desencadene la ovulación. Al principio de

la transición ocurren sólo ondas foliculares menores, con reclutamiento de folículos que crecen entre 6 y 21 mm de diámetro, regresando simultáneamente sin la formación de un folículo dominante (FD). Al final de la transición, ocurren ondas foliculares mayores, se produce el reclutamiento de un conjunto de folículos antrales que, si bien en la gran mayoría regresan, uno de ellos logra alcanzar mayor tamaño, llegando a más de 21 mm de diámetro (Ginther, E.L. Gastal, M.O. Gastal y Beg, 2004). La cantidad de folículos presentes en cada ovario aumentan durante la transición, y mediante ultrasonografía se observa la presencia de folículos de tamaños pequeños a medianos en forma de racimo de uva. Las concentraciones plasmáticas de LH se mantienen bajas durante este período, hasta que eventualmente el folículo preovulatorio se vuelve esteroideogénicamente competente para empezar a producir altos niveles de E_2 . El feedback positivo de estos, estimula la producción de LH hipofisaria, desencadenando su pico máximo responsable de la maduración del FD y la consecuente ovulación (McCue et al., 2007).

2.3.3 Temporada reproductiva

Durante este período las yeguas manifiestan sucesivos ciclos estrales, de aproximadamente 21 días cada uno, si la gestación no los interrumpe. Las variaciones en la duración total del ciclo y de cada una de sus fases se relacionan con la estación del año, presentando mayor variabilidad al inicio y al término de la estación reproductiva. La duración del estro es más corta en la mitad de la estación reproductiva y se asocia con la mejor fertilidad (LeBlanc, 1998).

2.3.4 Transición de otoño

Es el período que presenta mayor variación; como respuesta a la disminución del fotoperíodo al finalizar la temporada reproductiva, el comportamiento sexual y la ovulación se tornan más erráticas (LeBlanc, 1998). Se produce una pérdida gradual del soporte de gonadotrofinas para el funcionamiento ovárico, llevando a un menor desarrollo folicular. Este finaliza generalmente con la formación de un folículo preovulatorio que se hace anovulatorio o que involuciona (Schnobrich, 2018).

2.4 FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LA YEGUA: CICLO ESTRAL

El comienzo de la actividad reproductiva o pubertad se da alrededor de los 12 a 24 meses (Ramírez, Gutiérrez y Ramos, 2010). El ciclo estral consta de una fase folicular (estro), donde la hembra es sexualmente receptiva al macho, y el tracto genital se prepara para la aceptación y el transporte espermático al oviducto para la fertilización; y una fase luteal (diestro), donde la hembra deja de ser receptiva al macho y el tracto genital se prepara para aceptar y nutrir al embrión. El período de diestro termina con la regresión del CL, iniciando la siguiente fase folicular (Brinsko, Blanchard, Varner, Schumacher, Love, Hinrichs y Hartman, 2011). Durante la temporada reproductiva, el ciclo dura en promedio 21-22 días (rango de 18 a 24 días), de los cuales 4 a 7 días se corresponden al estro (Brinsko et al., 2011). La duración del diestro, es relativamente constante, 14-15 días, siendo menos afectada por la estación que el estro, el cual es más variable (2 a 12 días, o más) (Brinsko et al., 2011) (ver figura 2).

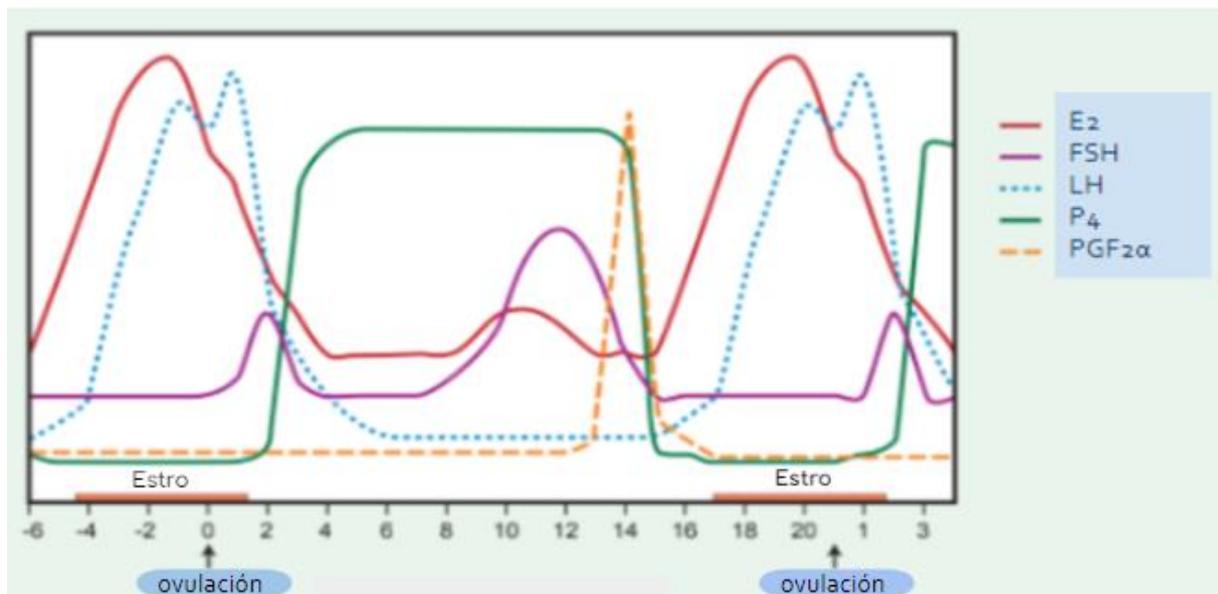


Figura 2. Ciclo estral de la yegua. Fuente: extraído y modificado de Brinsko et al., 2011

2.4.1 Estro

Momento en que la hembra es sexualmente receptiva frente al macho; permite ser montada, busca atención del semental, inclina la pelvis, orina frecuentemente en pequeñas cantidades (Pinto y Frazer, 2013), levanta la cola exponiendo la vulva, realizando movimientos de apertura y cierre de los labios vulvares produciéndose la eversión del clítoris (Ungerfeld, 2011). Su duración es de 5 a 7 días, cediendo dicho comportamiento 24-48 horas después de la ovulación. Se caracteriza por altas concentraciones de estrógeno (E_2) y LH y concentraciones basales de progesterona (P_4) (Pinto y Frazer, 2013).

La detección del estro, puede ser realizada mediante el examen del tracto reproductivo. Por vaginoscopia el cuello uterino se observa cada vez más rosado, húmedo, edematoso, relajado y abierto en el piso de la vagina (Pinto y Frazer, 2013). El folículo preovulatorio crece desde aproximadamente 30 mm (6 días antes de ovulación) a 45 mm el día de la ovulación, donde a menudo se ablanda y pierde su forma esférica 24 horas antes de la misma. El edema uterino disminuye unas 48 a 24

horas antes de la ovulación. Debido al gran tamaño del folículo preovulatorio y su proximidad al ligamento ancho, en este momento la yegua es sensible a la palpación del ovario (Pinto y Frazer, 2013).

2.4.2 Diestro

Se inicia con la ovulación y la consecuente formación de un CL secretor de P_4 . La duración del mismo permanece constante de 14 a 15 días (Brinsko et al., 2011), estando caracterizado por rechazo al macho, aumento del tono uterino, ausencia de edema uterino, estrechamiento cervical y elevados niveles de P_4 plasmática (Samper, 2008). Constituye la etapa más larga del ciclo estral y se caracteriza por la máxima actividad secretora del CL (Boeta et al., 2018), alcanzando su pico de concentración de P_4 circulante 6 días después de la ovulación (Brinsko et al., 2011). Si no ocurre fertilización y reconocimiento materno entre el día 12 y 14 post-ovulación, el endometrio libera prostaglandina F2 alfa ($PGF2\alpha$) y el CL sufre luteólisis; de lo contrario, este se mantiene para poder conservar la gestación, prolongándose un estado fisiológico similar al del diestro (Boeta et al., 2018). La luteólisis causada por la $PGF2\alpha$, resulta en una disminución de la P_4 circulante, que a su vez remueve el bloqueo secreción de LH. A continuación, se produce el crecimiento y maduración folicular y los signos de comportamiento característicos de la fase folicular del ciclo estral, comenzando un nuevo ciclo (Brinsko et al., 2011).

2.5 DESARROLLO FOLICULAR

2.5.1 Folículo ovárico

Es la unidad funcional del ovario, formado por una capa externa de células tecales, la membrana basal y una capa interna de células de la granulosa. Éstas

rodean y confinan al complejo ovocito-células de cumulus (Lanuza, 1999). Su función primaria en los mamíferos es la liberación de un ovocito para ser fertilizado, involucrando el crecimiento y maduración de este, así como los procesos de ovulación y división meiótica del ovocito, en respuesta a la secreción cíclica de gonadotrofinas hipofisarias. No todos los folículos responden a estas hormonas en el ciclo, sino que sólo un número limitado de ellos alcanza la ovulación durante la vida fértil, mientras que el resto degeneran en atresia (Lanuza, 1999).

2.5.2 Ovogénesis y Foliculogénesis

Son los procesos que en conjunto llevan a la formación y desarrollo del ovocito y del folículo respectivamente (Gigli, Russo y Agüero, 2006). La ovogénesis precisa de una serie de eventos que inducen la diferenciación celular, el desarrollo y la maduración del ovocito, mientras que la foliculogénesis promueve cambios morfológicos y funcionales dentro del folículo (Lema Veloz, 2017). La yegua se caracteriza por presentar una foliculogénesis estacional, siendo la única especie que puede llegar a presentar ovulaciones durante la fase del diestro (Gigli et al., 2006).

Las células germinales primordiales del embrión dan lugar a las ovogonias, quienes se dividen primero por mitosis (Gigli et al., 2006), teniendo al día 70 u 80 de gestación un gran número de ovogonias y ovocitos en los ovarios fetales (Mckinnon, Squires, Vaala, y Varner, 2011).

Las ovogonias se van a diferenciar en ovocitos primarios cuando inician la meiosis (Gigli et al., 2006). Dichos ovocitos, quienes están en un estado quiescente (detenidos en la profase I de su primera división meiótica), se rodean de células de la granulosa formando así los folículos primordiales (Gigli et al., 2006), quienes se caracterizan por presentar un ovocito desprovisto de zona pelúcida y estar rodeado

por una capa incompleta de células epiteliales planas (Lopez Mazz, 2009). Estos folículos primordiales forman la reserva gametogénica que la yegua utilizará durante toda su vida reproductiva; y ésta estimada en 36.000 - 46.000 folículos (Gigli et al., 2006).

La maduración continúa, el ovocito se agranda y multiplica sus organelos, las células foliculares se hacen cuboideas o cilíndricas bajas y proliferan, dando origen a un epitelio estratificado de células de la granulosa. Cuando ocurren estos cambios, el folículo pasa de folículo primordial a primario (Filipiak, Viqueira y Bielli, 2016). En esta etapa, además el ovocito comienza a rodearse de una capa glicoproteica denominada zona pelúcida (Gigli et al., 2006).

El folículo secundario se caracteriza por la proliferación de las células de la granulosa (alcanzando 6 a 12 capas de células), y por la formación de espacios entre ellas, conteniendo un líquido claro conocido como licor folicular (Bloom-Fawcett, 1992). Se produce un reclutamiento de células del estroma a nivel de la lámina basal, la cual separa las células de la granulosa con el estroma vecino, que se diferenciarán en células de la teca (Bloom y Fawcett, 1992). Las células de la teca, a su vez se diferenciarán en capa externa e interna, quienes rodean por fuera a las células de la granulosa (Gigli et al., 2006) y constituyen la fuente de andrógenos para la producción folicular de estrógenos (Lanuza, 1999). Hasta este estadio, los folículos se clasifican como preantrales, ya que todavía no se ha formado la cavidad antral (Gigli et al., 2006), y la foliculogénesis hasta esta etapa es independiente de gonadotrofinas, siendo su fase inicial estimulada por otros factores (Espinoza Villavicencio et al., 2007). Dentro de estos factores, producidos localmente (tanto dentro del ovario como dentro del folículo) se encuentran los miembros de la superfamilia que regulan la proliferación y diferenciación en una amplia variedad de tejidos tales como: factor

transformador de crecimiento - β (TGF β), factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF-9), hormona anti mülleriana (AMH), activinas, inhibinas y la proteína morfométrica ósea (BMP) (Gigli et al.,2006).

Los folículos antrales son caracterizados histológicamente por presentar una cavidad antral y por rodearse de varias capas cúbicas de células de la granulosa, las cuales secretan el líquido folicular (Armstrong, Xia, de Gannes, Tekpetey y Khamsi,1996), el cual comienza a producirse en las yeguas con folículos de 0,2 a 0,4 mm (Jaramillo Londoño y Pérez Mayor, 2013). Este se acumula produciendo un reordenamiento de las células del cúmulo y murales (Jaramillo Londoño y Pérez Mayor, 2013). Las células del cumulus juegan un rol fundamental en la regulación del desarrollo de los ovocitos, en la transferencia de nutrientes a este, y como mediador de las influencias hormonales en la maduración de los ovocitos (Armstrong et al.,1996).

El estímulo que inicia el crecimiento del folículo antral (o folículo terciario) es desconocido, pero la formación de la cavidad del folículo es dependiente de la actividad de las gonadotropinas. La IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina), principalmente promueve la mitosis de las células de la granulosa y por lo tanto el crecimiento folicular, al igual que la actividad esteroideogénica quien modulará el crecimiento, siendo quienes controlan la actividad de las gonadotropinas (Pérez Montenegro, 2015). En dichos folículos terciarios, las células de la teca interna van a responder al estímulo generado por la FSH produciendo andrógenos, estimulando así la activación de la enzima aromatasa en las células de la granulosa, transformando los andrógenos en estradiol (Gigli et al., 2006).

Las células de la granulosa de los folículos antrales, son caracterizadas por

tener una mayor expresión de receptores para FSH y las células de la teca para LH (Jaramillo Londoño y Pérez Mayor, 2013). Los folículos dominantes se convierten en folículos preovulatorios o folículos de Graaf, los cuales responden al estímulo de la LH reiniciando la meiosis y desencadenando la ovulación. En la yegua el folículo preovulatorio alcanza un tamaño mayor a 35 mm de diámetro (Gigli et al., 2006). Una vez alcanzada la ovulación, las células de la granulosa que forman el cumulus son expulsadas junto con el ovocito, mientras que las que constituyen la membrana granulosa y la teca van a permanecer en el ovario, se luteinizan y forman el nuevo cuerpo lúteo (Lanuza, 1999).

2.5.3 Dinámica folicular

El desarrollo folicular es un proceso dinámico, el cual se caracteriza por la proliferación y diferenciación de células foliculares, brindando un ambiente óptimo para que el ovocito madure y se prepare para la fertilización posterior a la ovulación. Dicho proceso depende de señales endocrinas, paracrinas y autocrinas a nivel del ovario y de un intercambio de señales endocrinas entre ovario e hipófisis (Rodríguez et al., 2013).

La dinámica folicular está dividida en activación del folículo primordial, reclutamiento, crecimiento y selección del folículo dominante (FD) y atresia de folículos subordinados (FS) (Parrado Soler y Fandiño Gomez, 2019). Las yeguas tienen una o dos ondas foliculares por ciclo, y los tipos de ondas pueden verse influenciados por la preñez, la etapa del ciclo estral, la temporada, la raza, y la edad (Bohlen, 2014). Una onda de crecimiento folicular involucra el desarrollo sincrónico de un grupo de folículos individualmente identificables, que ocurre al mismo tiempo en los dos ovarios (Ungerfeld, 2011). Dichas ondas dependen de la concentración de

FSH, la cual puede ser secretada siguiendo un patrón uni o bimodal; cuando sigue un patrón bimodal presenta un aumento plasmático entre el día 3 al 5 post-ovulación (asociado al pico de LH) y un segundo aumento entre los días 11 y 13 del ciclo (Gigli et al.,2006; Núñez Pintado, 2013). Este patrón bimodal es más común al comienzo de la temporada reproductiva, pasando a tener un patrón de secreción unimodal más entrada la temporada, aumentando la FSH solamente una vez por ciclo (Gigli et al.,2006).

En las yeguas, el aumento de FSH es responsable por la emergencia, reclutamiento y crecimiento de los folículos con diámetro de aproximadamente 6 a 13 mm. Después de 3 a 6 días, la concentración de FSH alcanza su valor máximo en sangre y los folículos mayores alcanzan un diámetro promedio de 19 a 22 mm, momento en que ocurre la selección y divergencia continuando con el crecimiento solo del folículo dominante que alcanzara la ovulación con un diámetro > 35 mm (Andrade Souza et al., 2011).

El mecanismo de selección folicular implica una interacción compleja y estrecha entre las gonadotropinas hipofisarias y las hormonas ováricas. La onda folicular primaria (onda que termina con la ovulación durante el estro) se origina durante el diestro, 7-8 días después de la ovulación, cuando una cohorte de folículos emerge a partir de un conjunto de folículos más pequeños a lo largo de varios días. Estos pasan por una fase de crecimiento común durante unos 6-7 días, en la que todos los folículos crecen a un mismo ritmo (3 mm/día). La desviación y selección se produce al final de esta fase, proceso que se da cuando el folículo mayor alcanza 21 a 23 mm de diámetro. El folículo dominante empieza a secretar inhibina y estradiol y se vuelve más sensible a la FSH y LH, debido en parte, a un aumento de receptores de gonadotropinas, estimulado por los altos niveles de estradiol intrafolicular. Como

consecuencia, éste continúa desarrollándose ante la bajada en los niveles de FSH circulante, mientras que los folículos subordinados comienzan a retroceder y se atresian (McKinnon et al., 2011).

Dichos mecanismos asociados al proceso de selección folicular, no se conocen bien, parecen implicar una ventaja en el desarrollo de un folículo sobre los otros, de forma tal que el futuro FD presenta una mayor capacidad de producción de E_2 , una mayor sensibilidad a la FSH y especificidad para responder a la LH a través de la inducción de receptores en las células de la granulosa. Se ha demostrado que las concentraciones foliculares de E_2 , IGF-1, inhibina-A y activina-A aumentan diferencialmente en los futuros FD antes del comienzo de desviación, pudiendo modular la capacidad de respuesta de FSH y LH del futuro FD (Samper, Pycock y Mckinnon, 2007).

La inhibina es una hormona glicoproteica producida en hembras por células de la granulosa del folículo dominante en desarrollo. Las concentraciones de inhibina se correlacionan positivamente con el estradiol e inversamente con la FSH. El papel fisiológico principal de la inhibina es la supresión de la secreción hipofisaria de FSH, y, por tanto, del proceso de selección del folículo. Los niveles de inhibina aumentan durante el celo, alcanzan su máximo en el día de la ovulación y disminuyen a niveles bajos durante el diestro (McKinnon et al., 2011)

El crecimiento del FD, después del proceso de selección, es menos dependiente de FSH, cuya concentración se mantiene en niveles basales debido a la producción de estrógeno (E_2) e inhibina, que generan una retroalimentación negativa en la hipófisis. A su vez cuando la FSH baja, los folículos muestran cambios característicos, como una reducción de la actividad estrogénica, disminución en los

niveles de inhibina y mayores cantidades de proteínas de unión a la IGF-1, terminando con la apoptosis de las células de la granulosa (Mihm y Bleach, 2003).

En yeguas, posterior a la desviación, el crecimiento del FD se le atribuye a la LH. La transición del folículo en crecimiento a FD y su posterior crecimiento se asocia con las concentraciones de FSH y LH sistémicas, viéndose también afectada por factores intrafoliculares. Se ha observado una interrelación dinámica entre la selección de folículos y los factores intrafoliculares, como son el IGF-1 libre, las proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP), la proteasa de IGFBP, activinas, inhibinas, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), esteroides, hormona de crecimiento (GH), entre otras. Además, los factores intrafoliculares, especialmente el IGF-1 libre, intervienen en el desarrollo folicular continuo y la ciclicidad ovárica de las yeguas. Éste estimula el crecimiento de los folículos ováricos mediante la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa en las últimas etapas del desarrollo folicular. Por otro lado, las IGFBP juegan un papel vital en la regulación de la concentración de IGF-1 libre (Bashir, Ishak, Gastal M.O, Roser y Gastal E.L, 2016).

2.6 OVULACIÓN

La ovulación es el momento del ciclo donde el oocito es liberado al tracto reproductivo (Perez Anzures, 2019), a través del rompimiento del folículo ovárico, permitiendo su captación por las tubas uterinas y subsecuente fertilización (Morel, 2008). Esto ocurre en respuesta a cambios endocrinos (aumento gradual y progresivo de LH), bioquímicos y citológicos, que ocasionan el colapso del folículo preovulatorio, dándose en las yeguas 24 a 48 horas antes de finalizar el celo (Perez Anzures, 2019). El hecho de que la LH en yeguas aumente en forma gradual y progresiva (a diferencia

de lo que ocurre en la mayoría de las especies donde es repentino), se debe a la alta concentración de ácido siálico que le otorga a la LH una mayor vida media al metabolizarse más lentamente en hígado. La concentración máxima en plasma de LH en yeguas se alcanza 24 horas después de la ovulación (Gigli et al., 2006). La ovulación involucra una secuencia de eventos, que llevan a la ruptura del FD en la zona del ovario donde se encuentra la fosa de ovulación. Ocurre un proceso de remodelación, adelgazamiento y ruptura de la pared folicular, a nivel del estigma (superficie del folículo desprovista de vasculatura) con la consecuente liberación del líquido folicular, células de la granulosa y el complejo cumulus-ovocito al infundíbulo del oviducto (Boeta et al., 2018).

El aumento de los niveles de LH que precede a la ovulación estimula la síntesis y liberación local de Prostaglandina E_2 (PGE_2), Prostaglandina $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) y el inicio de la producción de progesterona (P_4) por parte de las células foliculares. La PGE_2 incrementa la permeabilidad vascular de la teca, dicho cambio junto al aumento preovulatorio del aporte sanguíneo, determinan un aumento del líquido folicular. La $PGF_2\alpha$ provoca la liberación de enzimas lisosomales por parte de las células de la granulosa y el aumento local de P_4 lleva a que las células de la teca interna sinteticen colagenasa debilitando a la túnica albugínea que conforma la pared folicular. Cuando esto sucede, se forma el estigma en la zona apical siendo indicativo de que se acerca la ovulación; este va a ser el sitio por el cual se va a romper el folículo (Boeta et al., 2018). Después de la ovulación, el folículo colapsa, pero se vuelve a llenar de sangre en aproximadamente 12 horas, lo que se denomina cuerpo hemorrágico; y la luteinización de esta estructura da como resultado la formación de un CL (England, 2007).

Cabe destacar que a pesar de que la yegua presenta una inversión en las capas del estroma ovárico, la cadena de eventos es similar al del resto de los mamíferos, ya que el lugar principal de acción de los péptidos vasoactivos, las prostaglandinas y el TNF- α , son las células epiteliales del folículo, quienes entran en íntimo contacto con la superficie ovárica en la fosa de ovulación (Andrade Souza et al., 2011).

2.7 LUTEOGÉNESIS

El CL es una glándula endocrina transitoria que produce P_4 , y su desarrollo puede dividirse en tres etapas: luteogénesis, fase de mantenimiento y luteólisis o regresión. Estos cambios son acompañados por variaciones en el flujo sanguíneo (Reynolds y Redmer, 1999).

La luteogénesis, incluye la diferenciación e integración de las células derivadas de la granulosa y la teca, así como de las células vasculares y reticuloendoteliales del folículo post-ovulatorio (Roberto da Costa, Branco, Pessa, Silva y Ferreira-Dias, 2005). Dicho proceso comienza antes de la ovulación con cambios en la población de receptores de gonadotrofinas (Salles y Araújo, 2010), siendo la LH la gonadotropina que más actúa en estos receptores, llevando a la ruptura del folículo y su posterior transformación en tejido luteal (Salles y Araújo, 2010).

Las células que darán origen al CL también están influenciadas por varios factores angiogénicos y mitogénicos (Salles y Araújo, 2010). Los factores de crecimiento, principalmente VEGF y bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico), son responsables del desarrollo y mantenimiento de la densa red de capilares neoformados, además de contribuir de manera paracrina y autocrina a la producción

de P_4 . Otros agentes como péptidos, esteroides y prostaglandinas son responsables de modular la función lútea y la regulación fina de la glándula (La Paz et al., 2007).

Las células esteroideogénicas del CL, han sido clasificadas de acuerdo a su tamaño en células chicas y células grandes. Durante la luteinización las células de la teca interna y de la granulosa migran y se distribuyen en el espacio que previamente fue ocupado por el folículo ovulatorio. Las células de la teca interna se multiplican y se diferencian en células lúteas chicas (Hernández y Zarco Quintero, 1998). A diferencia de otras especies, en la yegua, las células esteroideogénicas del cuerpo lúteo, parecen derivar exclusivamente de células de la granulosa. Las células de la teca interna al momento de la ovulación muestran signos de degeneración tales como: condensación del citoplasma, incremento de la eosinofilia, picnosis, fragmentación y fagocitosis. Veinticuatro horas después de la ovulación, la degeneración es casi completa, siendo sustituidas por fibroblastos hipertrofiados, los que pueden confundirse con células tecales dando la errónea idea de que estas últimas contribuyen al tejido luteal (Van Niekerk, Morgenthal y Gerneke, 1975).

Las concentraciones máximas de P_4 (superior a 4 ng/ml) se alcanzan a los 4 a 7 días después de la ovulación (Aurich, 2011), declinando nuevamente hacia el día 13-15 por acción de la $PGF2\alpha$ (Ginther, 2012) coincidiendo con el inicio de la luteólisis (Aurich, 2011).

2.8 LUTEÓLISIS

La luteólisis es el mecanismo por el cual el CL sufre una degeneración irreversible caracterizada por la caída de las concentraciones plasmáticas de P_4 (Luz, 2004), < 1 ng/ml (Ginther y Beg, 2012). En la yegua comienza el día 14 a 16 post-ovulación (McKinnon et al., 2011). La $PGF2\alpha$ es la responsable del proceso de

luteólisis (Luz, 2004), ésta es liberada por el endometrio en forma pulsátil, liberándose de cinco a ocho pulsos durante dos a tres días (Acosta y Miyamoto, 2004; Salles y Araújo, 2010), lo que conduce a la degeneración de la vasculatura y de las células esteroidogénicas, siendo las células endoteliales de la microvasculatura las primeras en sufrir el proceso de apoptosis (Salles y Araújo, 2010).

Si bien no está claro cómo se desencadena el proceso de luteólisis, parece haber dos aspectos críticos, por un lado, el desarrollo de receptores uterinos para oxitocina y la capacidad de liberar $\text{PGF2}\alpha$ en respuesta a esta; y por otro lado el aumento de la expresión de la COX-2 en el endometrio, y por tanto la capacidad de producir prostaglandinas, entre los días 13 y 15 post ovulación (McKinnon et al., 2011). La regulación en la expresión endometrial de COX-2 es considerada un evento clave en la inducción de la luteólisis, por ser la enzima inductora de la producción de $\text{PGF2}\alpha$ (Boerboom et al., 2004).

Aunque se supone que la P_4 , el estrógeno y sus respectivos receptores endometriales son fundamentales para establecer los diversos componentes de la cascada luteolítica, no está claro cómo lo hacen; como tampoco está claro de qué manera se pone en marcha el círculo de retroalimentación luteolítica $\text{PGF2}\alpha$ -oxitocina. Además, no se sabe exactamente cómo ejerce los efectos luteolíticos la $\text{PGF2}\alpha$, se cree que lo más importante sería la vasoconstricción, la reducción del transporte intracelular de las células lúteas de colesterol y la estimulación del flujo de leucocitos, quienes, a su vez, secretan citoquinas capaces de desencadenar la apoptosis de las células lúteas y la remodelación de la matriz lútea (McKinnon et al., 2011).

2.9 MANEJO REPRODUCTIVO: CONTROL HORMONAL DEL CICLO ESTRAL

Un adecuado manejo reproductivo permite mejorar la eficiencia de la producción equina y de esta forma lograr un aprovechamiento mayor y más rápido de la mejora genética (Melo et al., 2012). La fisiología reproductiva de la yegua, con la presencia de un anestro estacional, limita las oportunidades de concepción, transformando al manejo hormonal en una herramienta fundamental para optimizar el uso de los ciclos estrales (Melo et al., 2012).

Por otro lado, la gran variación en la duración del estro y en el intervalo entre su inicio y la ovulación, hacen que estimar con precisión dicho momento sea una tarea complicada pero necesaria (Farias, Neves, Fiala Rechsteiner, y Tarouco, 2016), ya que se obtienen mayores tasas de concepción cuando se deposita el semen en el tracto reproductivo de la yegua próximo a la ovulación (Woods, Bergfelt y Ginther, 1990). De esta forma, la utilización de inductores de ovulación mejora la eficiencia reproductiva, reduce el período del estro y permite sincronizar inseminaciones, disminuyendo así gastos en transporte y optimizando las dosis de semen y el uso del padrillo (Melo et al., 2012). En la actualidad la administración de gonadotrofina coriónica humana (hCG) o acetato de deslorelina sigue siendo una de las prácticas más confiables como método para inducir la ovulación de un folículo preovulatorio en yeguas (Brinsko et al., 2011).

3.0 CONTROL HORMONAL APLICADO A Y SU USO EN BIOTECNOLOGIAS DE LA REPRODUCCIÓN

La biotecnología de la reproducción comprende diversas técnicas, que van desde la IA hasta la clonación, y están orientadas a mejorar la eficiencia reproductiva de los animales. Son técnicas que presentan importancia en sí mismas, y pueden ser

usadas como herramientas en la aplicación de otras más modernas; como ser el caso de la IA, en los programas de superovulación (SO) y TE, quien a su vez es herramienta fundamental para la producción in vitro de embriones y clonación animal (Palma y Brem, 2001). Las biotecnologías se pueden clasificar en base a su desarrollo en cinco generaciones: la primera (1908): inseminación artificial; la segunda (1970): caracterizada por el control y estimulación hormonal de la hembra, la TE , congelación y división de embriones; la tercera (1980) se corresponde con el sexado de embriones y espermatozoides y producción in vitro de embriones; la cuarta (1990) se identifica con la clonación con células somáticas y la quinta (2000) con la transgénesis y la edición génica (Palma y Brem, 2001).

3.1 Inseminación artificial (IA)

Es la técnica mediante la cual se deposita un número adecuado de espermatozoides vivos, dentro del útero en el momento óptimo (Samper, 2009). Presenta diversas ventajas, no sólo a nivel sanitario sino también de manejo ya que, mediante esta técnica, es posible que un único padrillo pueda cubrir un mayor número de yeguas, además evita el traslado de los animales reduciendo los riesgos y costos asociados (Intervet, 2007).

Para la inseminación artificial se puede usar: semen fresco, cuando la colecta del padrillo se realiza en el lugar y el semen es utilizado inmediatamente (ya sea puro o diluido); semen refrigerado, después de la colecta el semen es diluido, enfriado lentamente a 5° - 8° C y transportado para ser utilizado en las siguientes 12-36 horas; y semen congelado, el cual luego de la colecta es procesado para ser almacenado en nitrógeno líquido durante un período de tiempo indefinido (Samper, 2009).

La dosis inseminante recomendada desde hace más de 30 años es de 500×10^6 espermatozoides con motilidad progresiva (PMS). Dicha dosis sigue siendo aceptada como una dosis de inseminación estándar, independientemente de la fertilidad del padrillo o de las mejoras que se han realizado en el manejo de las yeguas y en los diluyentes de semen. Las dosis de inseminación para el semen refrigerado y congelado se han extrapolado a partir de la misma. Cuando se envasa semen para su refrigeración y transporte, se recomienda una dosis de 1×10^9 de espermatozoides con motilidad progresiva (EMP) (Brinsko, 2006), esta recomendación se fundamenta en el estudio realizado por Hamilton y colaboradores en 1984 en el cual usó un primer prototipo del Equitainer TM. En este trabajo, citando el informe de Pickett y Voss (1975) de que 500×10^6 EMP era la dosis óptima de esperma requerida para la inseminación y asumiendo una mortalidad del 50% durante el transporte, se envasaron entre $1,0$ y $1,5 \times 10^9$ espermatozoides por envío (Douglas-Hamilton, Osol, R., Osol, G., Driscoll y Noble, 1984). A partir de ahí, los avances en el diseño y el funcionamiento de los contenedores de transporte, los diluyentes, las proporciones de dilución y las concentraciones de espermatozoides óptimas han mejorado mucho la supervivencia de estos, sin embargo, la dosis recomendada para el envío de semen refrigerado sigue siendo 1×10^9 EMP (Brinsko, 2006).

Con respecto a la inseminación con semen congelado, durante la última década se han conseguido importantes logros en el procesamiento, congelación e inseminación (Samper, 2009). Si bien las ventajas de su uso están establecidas (Samper, 2009) existen también algunas limitantes como ser un manejo más intensivo de las yeguas. Dado que se recomienda que la inseminación con semen congelado se realice dentro de 12 horas previas o 6 horas posteriores a la ovulación, es necesario un mayor número de revisiones (Lazcano y Pereyra, 2020).

El uso de agentes inductores de la ovulación son una parte crucial del manejo reproductivo en yeguas, ya sea para monta natural, como para programas de inseminación con semen refrigerado o congelado, donde la administración de estos en el momento óptimo del ciclo estral permite una inseminación programada en relación a la ovulación esperada (Lindholm, Ferris, Scofield y McCue, 2011).

3.2 Transferencia de embriones (TE)

La TE consiste en la colecta y transferencia de un embrión desde una yegua donante de genética superior, al útero de otra yegua denominada receptora, la cual tiene como función gestar y criar un potro de alta calidad (Intervet, 2007).

Los beneficios de esta técnica radican en la posibilidad de obtener potrillos de hembras de edad avanzada o muy temprana, de yeguas con antecedentes de reabsorciones embrionarias y/o abortos y de yeguas en competencia, así como, la posibilidad de obtener más de un potrillo, por yegua por año que serán gestados por yeguas receptoras (Camps, 2006).

La mayoría de los embriones equinos recogidos en la actualidad, tienen su origen en ovulaciones espontáneas simples. Estos son recogidos mediante el lavado del lumen uterino de la donante, entre el 6º y el 9º día después de la ovulación (Squires, Carnevale, McCue, y Bruemmer, 2003), para luego ser transferidos al útero de la yegua receptora sincronizada previamente (Losinno y Aguilar, 2002). Distintos factores pueden afectar la recuperación del embrión, incluyendo el día de la misma, el número de ovulaciones, la edad de la donante y la calidad del semen (Squires et al., 1999).

En la cría moderna de caballos, la predicción precisa de la ovulación es un requisito previo de los sistemas de gestión eficientes. Por esto, la inducción

farmacológica o la "programación" de la ovulación se ha adoptado de forma rutinaria en la práctica de yeguas de cría. Mediante el uso de un agente inductor de la ovulación, se puede reducir la ventana de tiempo dentro de la cual es probable que se produzca la ovulación y, por lo tanto, optimizar las tasas de preñez, organizando los trabajos para el momento más apropiado en relación con la ovulación (Campbell, 2012).

4.0 INDUCTORES DE OVULACIÓN

Predecir la ovulación en yeguas, en comparación con otras especies es más complejo, debido a la prolongación en el aumento de la LH. La predicción de la ovulación es necesaria para una producción eficiente, ya sea en sistemas de monta natural o de IA. Lo ideal sería que, para obtener una gestación, la yegua fuera cubierta o inseminada una vez al año, minimizando así el número de cubriciones/inseminaciones, lo cual reduce la presión sobre los padrillos y la agresión al útero, reduciendo así las posibilidades de endometritis inducida por estas, aumentando la tasa de preñez y reduciendo costos operativos (Campbell, 2012).

Las principales ventajas de predecir el momento de ovulación son:

1. Utilizar solamente un servicio por ciclo, esto favorece a los padrillos de alta demanda y reduce la contaminación uterina (particularmente necesario en yeguas con clearance uterino retrasado o mayor susceptibilidad a infecciones uterinas);
2. Programar los transportes de las yeguas hacia los padrillos;
3. Realizar las inseminaciones cercanas a la ovulación para semen refrigerado o congelado, así como para padrillos con baja fertilidad;
4. Sincronizar donante y yeguas receptoras en programas de TE

5. Reducir costos veterinarios y personal capacitado (Samper, 2008).

Los agentes farmacológicos para inducir la ovulación, presentan máxima eficacia cuando son administrados en yeguas con un edema endometrial evidente, cuello uterino relajado y un folículo de 35 mm de diámetro (Samper, 2008). Un FD, maduro, que normalmente ovularía en 3-5 días puede madurar antes y ovular en un plazo predecible de 24 a 48 horas post tratamiento. Cuando la ovulación ocurre antes de las 24 hs, es probable que el folículo estuviera destinado a ovular previo a la administración del agente inductor, en cambio cuando ovula más de 48 hs después de la administración, seguramente este no se haya administrado cuando había un folículo maduro. Normalmente, un folículo responderá a un agente inductor cuando la yegua esté en celo durante 2 o 3 días y este haya alcanzado un tamaño mínimo característico para la raza de la yegua (McKinnon et al., 2011). Siempre existió un gran interés por saber el motivo por el cual los agentes inductores en ocasiones no consiguen inducir la ovulación dentro del plazo previsto; la razón más aparente del "fracaso" de cualquiera de estos agentes es, de hecho, la administración en un momento inadecuado, basada en una excesiva confianza en el tamaño del FD, y en no tener suficientemente en cuenta la relajación cervical, el edema uterino y, los patrones de comportamiento, así como los días de celo (Campbell, 2012). La elección del agente inductor, debe basarse en el historial de inducción de ovulación de la yegua (tanto del año en curso, como en los anteriores), edad, tipo de sistema de cría y aspectos prácticos del momento de administración y del manejo posterior (particularmente para las inseminaciones con semen congelado) (Campbell, 2012).

4.1 GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA (HCG)

La hCG, fue la primera hormona utilizada para inducir la ovulación en yeguas y

aún es de las más utilizadas en la actualidad (Figueiredo et al., 2011). Es una hormona glicoproteica (Ungerfeld, 2011), secretada por las células sincitiales de la placenta humana (Wilson, Downie, Hughes y Roser, 1990). Está constituida por 2 cadenas de aminoácidos denominadas alfa (α) y beta (β), unidas no covalentemente por un puente sulfhidrilo, donde sí se separan pierden su actividad biológica; es decir, que ninguna tiene actividad por sí misma (Velázquez, 2014). La subunidad α es idéntica a la de la hFSH, hLH y hTSH; y la β es altamente homóloga a la de la hLH (Ungerfeld, 2011), y 51% homóloga a la subunidad β de la gonadotropina coriónica equina (eCG) (Greco, 2016). Presenta gran tamaño, actividad LH (Figueiredo et al., 2011), y una vida media de 8 a 12 horas en esta especie (Greco, 2016). Por tener una estructura semejante a la proteína LH, sus propiedades como inductor de la ovulación, son el resultado del efecto directo sobre la disminución en la concentración del E_2 , el aumento de la LH y la ovulación dentro de las 48 h posteriores al tratamiento (Ferreira-Silva et al., 2018).

El mecanismo de acción para inducir la ovulación en yeguas, es la unión de la hCG a los receptores de LH presentes en las células de la granulosa y la teca del folículo ovárico, provocando la maduración y la ovulación del folículo (Ferris, Hatzel, Lindholm, Scofield, y McCue, 2012) en un tiempo predecible, cuando se seleccionan yeguas en función del diámetro folicular (folículo de al menos 35 mm) y con signos de estro (pliegues endometriales que acrediten el edema) (Carleton, 2011); presentando un mayor beneficio cuando se utiliza en los primeros meses de la temporada reproductiva (Brinsko et al., 2011). Barbacini y colaboradores en un trabajo realizado en el año 2000, observó que al final de la temporada, la distribución de la ovulación se desplaza significativamente a las 24 hs mientras que en la primera parte un 83% ocurre dentro de las 25 a 48 hs frente a un 9% que se da dentro de las 0 a 24hs.

La administración de hCG, a una yegua en celo con un folículo de 35 mm de diámetro induce la ovulación en aproximadamente 36 horas (Ferris et al., 2012). Más del 80% de las yeguas tratadas ovularán en un plazo de 36 a 48 horas después del tratamiento (Carleton, 2011), en cambio aquellos folículos en vías de regresión no responden a la hCG (Neely et al., 1989). Si se desconoce el día del estro y el folículo es mayor a 35mm de diámetro, la ovulación puede ser menos predecible, pudiendo ocurrir dentro de las 24 hs post administración (Brinsko et al., 2011).

La dosis recomendada de hCG varía, pero oscila entre 1500 y 3300 unidades internacionales (UI) administradas por vía intravenosa (IV) o intramuscular (IM) (Figueiredo et al., 2011). Si bien está prescrita por ambas vías, especialistas en fisiología reproductiva equina la recomiendan por vía IV, ya que además de ser una ruta segura, se espera que disminuya la formación de anticuerpos anti hCG (Youngquist y Threlfall, 2007), ya que, al ser una glicoproteína, el organismo la detecta como un antígeno y genera inmunidad (Bartoli, 2009), provocando la subsecuente pérdida de la eficacia farmacológica (Figueiredo et al., 2011). Por esto, se recomienda que la hCG no se utilice más de una o dos veces durante una temporada de cría (McCue, Hudson, Bruemmer y Squires, 2004).

En la literatura existe un debate sobre si las yeguas en las cuales se utiliza hCG repetidamente tienen una respuesta menos fiable, debido posiblemente a la formación de anticuerpos anti-hCG (Campbell, 2012). Un estudio retrospectivo realizado por Barbacini y colaboradores en el año 2000 donde se evaluaron 559 yeguas y 1040 ciclos, concluyó que la inactivación de hCG por la formación de anticuerpos específicos no debería preocupar demasiado, ya que en éste sólo un 9% de los ciclos considerados no dieron como resultado una ovulación.

Actualmente, parece ser que la falta de respuesta a la inducción de la ovulación con hCG después de su reiterado uso, está relacionado con la dosis de hCG utilizada, y que dicho efecto puede minimizarse reduciendo la dosis (Campbell, 2012). Administrar hCG en dosis de 1000 a 3000 UI, IV o IM son suficientes para inducir la ovulación de folículos preovulatorios con un diámetro \geq 35mm en yeguas con ciclos estrales regulares (Brinsko et al., 2011).

Un trabajo retrospectivo en el 2008 realizado por Morel y Newcombe, donde se evaluó el efecto de ésta sobre la ovulación dentro de las 48hs, usando dosis de 750 y 1500 UI SC se vió que no hubo diferencias significativas entre ellas, es decir que la dosis de 750 UI logra inducir la ovulación. Por otro lado, un estudio realizado en 2011 por Beal y colaboradores, donde se usaron dosis de 1000, 1500 y 2000 UI IV concluyó que las tres dosis terminaron con la ovulación de los folículos entre 24-48 hs post administración.

Con el fin de sustituir la hCG para inducir la ovulación y reducir los efectos no deseados (producción de anticuerpos), se han desarrollado fármacos alternativos como ser el acetato de deslorelina y el extracto de pituitaria equina (EPE), dos alternativas para sincronizar la ovulación, que pueden ser usados en varios ciclos consecutivos sin inducir la formación de anticuerpos (Melo et al., 2012).

4.2 ANÁLOGOS DE GNRH

La GnRH es un decapeptido, que desempeña un papel clave en el desarrollo y el mantenimiento de la reproducción (Ungerfeld, 2011). El hipotálamo segrega GnRH, caracterizada por promover la secreción de FSH y LH, por el lóbulo anterior de la hipófisis o adenohipófisis, estimulando la función ovulatoria (Cortés-Vidauri et al., 2018).

Han sido creados numerosos análogos de la molécula mediante sustitución de aminoácidos (aa) en varias posiciones a lo largo de la cadena, donde la sustitución de los dos aa terminales nos da una molécula de afinidad altamente reducida por el receptor de GnRH. En comparación, la sustitución de Gly 6 por aminoácidos-D voluminosos que contienen cadenas laterales hidrofóbicas, da como resultado una molécula más estable, resistente a la hidrólisis enzimática (Hyland,1993), con mayor unión a proteínas circulantes y membranas; aumentando así la afinidad de sus semejantes por el receptor (Conn y Crowley, 1994). Estos tienen un período de acción más prolongado que la GnRH nativa (Hyland, 1993), por tanto, los análogos de GnRH son más potentes y presentan una vida media más larga que el GnRH endógeno, siendo considerados más eficientes para sincronizar e inducir la ovulación (Farias et al., 2016), incluso en yeguas en anestro (Ginther y Bergfelt,1990).

Como ya se mencionó, el ciclo ovulatorio en la yegua se caracteriza por períodos de secreción diferencial de FSH y LH, predominando éstas en la fase lútea y durante la oleada ovulatoria respectivamente. La GnRH debe regular la secreción diferencial de éstas durante el ciclo, donde una de las formas es a través de la frecuencia en los pulsos de GnRH, indicando así a los gonadotropos que sinteticen y secreten preferentemente FSH o LH, siendo este efecto independiente de la retroalimentación ovárica. Durante la fase lútea los pulsos de GnRH son lentos, favoreciendo así la liberación de FSH y la transcripción de la subunidad β de la FSH y durante la oleada ovulatoria esos pulsos se vuelven rápidos, y favorecen la liberación de LH y la transcripción de la subunidad β de la LH (McKinnon et al., 2011). Los cambios en la frecuencia de los pulsos de GnRH no son los únicos medios por los que la LH y la FSH pueden ser reguladas, los ovarios producen hormonas esteroideas y proteicas; las más estudiadas en yeguas son los esteroides (estradiol y progesterona)

y la hormona proteica inhibina, quienes actúan en la hipófisis y/o el hipotálamo afectando la secreción de FSH y LH, a menudo de forma diferencial (McKinnon et al., 2011).

La respuesta al tratamiento crónico con agonistas de la GnRH tiene dos componentes: la fase aguda, que puede durar varios días y se caracteriza por un aumento inmediato de la LH y la FSH en plasma, seguido de un retorno a las concentraciones basales; y una fase crónica por una exposición continuada al agonista, durante la cual se bloquea la secreción pulsátil de LH. Esto último ocurre como consecuencia de la regulación a la baja de los receptores de GnRH en las células gonadotropas y del desacoplamiento de las vías de los segundos mensajeros dentro de las mismas. La falta de secreción pulsátil de LH, y probablemente de FSH, se mantiene mientras el agonista de GnRH esté presente en la circulación a una concentración umbral (D'Occhio, Fordyce, Whyte, Aspden y Trigg, 2000).

4.2.1 Acetato de Deslorelina

Es un agonista de GnRH, aproximadamente 144 veces más potente que la GnRH nativa utilizado para inducir la ovulación en yeguas ciclando (Farquhar, McCue, Vanderwall y Squires, 2000). Estimula la liberación de LH desde el lóbulo anterior de la hipófisis (adenohipófisis), induciendo la maduración de los folículos y la consiguiente ovulación (Samper et al., 2007).

El uso de acetato de deslorelina al inicio de la estación reproductiva, da como resultado menores tasas de ovulación dentro de las 48 horas, ya que las yeguas tienen concentraciones plasmáticas de LH más bajas; por esto, se recomienda el uso de hCG tanto al inicio como al final de la época reproductiva (Boakari, 2014), la cual actúa

directamente sobre los receptores ováricos de LH, mientras que el acetato de deslorelina estimula la liberación de LH por la hipófisis (Squires, 2008).

Una de sus ventajas, es que su uso repetido no hace que las yeguas se vuelven refractarias por tener un peso molecular más bajo, a diferencia de lo que puede ocurrir con el uso de hCG en algunas yeguas (Boakari, 2014).

La administración de agonistas de GnRH (como ser el acetato de deslorelina) han sido asociados a un retraso en el desarrollo folicular y un aumento del intervalo interovulatorio (McCue, 2000). Dentro de las potenciales causas a esto se incluyen la regulación a la baja de los receptores hipofisarios de GnRH, el agotamiento de las reservas de LH y FSH en la hipófisis, o una combinación de ambos (Farquhar, McCue, Nett y Squires, 2001), determinando una disminución de la población folicular (McCue, 2000). Estos efectos fueron principalmente observados con el uso del Ovuplant, producto comercial que consiste en un pellet biocompatible impregnado con 2,1 mg de acetato de deslorelina, la cual se libera lentamente durante un período de dos a tres días (Farquhar et al., 2000). Por esto se optó por la retirada del implante 48 horas después de su inserción, evitando así la desregulación hipofisaria y eliminando el problema de la falta de retorno al celo (McCue, Magee, y Gee, 2007).

En tanto, el acetato de deslorelina inyectable no induce un aumento del intervalo interovulatorio, probablemente porque su biodisponibilidad sea más corta y en consecuencia no provoque una disminución de la actividad hipofisaria (McCue et al., 2007). Se recomienda una dosis de 1,5 mg por vía IM (Samper, 2007), y para su administración se debe detectar previamente (mediante palpación rectal o ecografía) un folículo ovárico en desarrollo de más de 30 mm de diámetro. La monta o IA debe efectuarse antes de las 48 horas posteriores a la aplicación del tratamiento, momento

en el cual ocurre la ovulación (Ovuplant, 2016). Un estudio realizado por Kino et al., (2014) demostró el efecto luteotrófico de ésta al estimular la secreción de LH. Se observó un aumento en los niveles de LH y P₄ postratamiento, a las 4 y 8 hs respectivamente, en yeguas tratadas con 750 µg IM de acetato de deslorelina.

4.2.2 Acetato de Histrelina

El acetato de histrelina difiere del decapeptido natural GnRH en dos sustituciones de aminoácidos, en la posición del aminoácido 6, donde la L-glicina ha sido sustituida por el aminoácido D-histidina, y en la posición 10, donde la glicina y su amino terminal han sido sustituidos por N-etilamida (Pinto, 2013).

Es un potente análogo sintético de GnRH para la inducción y sincronización de la ovulación en yeguas (Strelin®, 2021), siendo más potente que el acetato de deslorelina o acetato de buserelina (Voge, Sudderth, Brinsko, Burns y Blanchard, 2012). Fue demostrada su capacidad para inducir y sincronizar las ovulaciones a los 2 días de tratamiento, a dosis de 250, 500 y 1000 ug, por vía IM, al igual que la deslorelina y la hCG (Voge et al.,2012; Kiser et al.,2013), incluso al inicio de la temporada reproductiva, cuando se sabe que las concentraciones plasmáticas de LH son más bajas (Santos, De Oliveira y Ferreira, 2019). Debe ser aplicado en yeguas que presentan folículos ≥ 33mm de diámetro, determinados por palpación transrectal y ultrasonografía (Strelin®, 2021).

La formulación del acetato de histrelina de liberación sostenida induce eficazmente la ovulación dentro de los 2 días posteriores a su administración. Además, la eficacia del tratamiento con acetato de histrelina (500 o 1000 ug) para inducir la ovulación dentro de las 48 horas posteriores a su administración no difiere de la promovida por la hCG o del acetato de deslorelina (Pinto, 2013).

Estudios realizados por Lindholm., et al 2011; Morrissey et al.,2019 al comparar el acetato de histrelina con el acetato de deslorelina, vieron que no hubo una diferencia significativa en el intervalo desde el tratamiento hasta la ovulación y el porcentaje de yeguas que ovularon en las 48 horas post tratamiento.

4.2.3 Otros usos de la GnRH

Dentro de los protocolos para el manejo reproductivo con GnRH, se los utilizan para inducir el celo y la ciclicidad en yeguas anestrícas (Nagao et al., 2012), logrando la ovulación mediante la administración de GnRH sola o en combinación con antagonistas de la dopamina, y mediante la administración de extractos hipofisarios. Además, la terapia con progesterona se utiliza ampliamente en un intento de acelerar la ovulación al final de la transición de primavera, aunque existe controversia sobre su eficacia real. (Donadeu y Watson, 2007). La capacidad de los tratamientos con GnRH para inducir la ovulación se reduce drásticamente en yeguas con bajos niveles de actividad ovárica como durante el anestro profundo, teniendo unas tasas de éxito del 26% en yeguas con folículos pequeños (≤ 15 mm) al comienzo del tratamiento, frente al 70% en yeguas con folículos medianos y grandes (21-29 mm). Está claro que el proceso de recrudescimiento ovárico estacional no está controlado únicamente por el hipotálamo y la hipófisis, sino también por el propio ovario, que dicta la capacidad de respuesta de los folículos a los estímulos tróficos en cada momento y por tanto el momento de la ovulación (Donadeu y Watson, 2007).

Por otro lado, hay evidencia de una mayor incidencia de ovulaciones múltiples en algunas yeguas con dichos tratamientos. (Nagao et al., 2012), ocurriendo resultados similares con el uso de FSH porcina, extracto crudo de hipófisis equina

(EPE), gonadotropina coriónica equina o inmunización contra la inhibina (Ángel y Bran, 2010).

El principal objetivo de las ovulaciones múltiples es elevar la eficiencia reproductiva y económica de los programas de TE, por métodos convencionales y por métodos de fertilización in vitro, dado que con la multiplicación del número de ovulaciones se tendría un mayor número de embriones por donadora (McCue, 1996).

4.2.4 Prostaglandina

Los prostanooides son metabolitos obtenidos del ácido araquidónico a través de la vía metabólica conocida como ciclooxigenasa; entre ellos pueden mencionarse tromboxanos y prostaglandinas, considerándose en este último grupo a la PGF₂α como sustancia con actividad marcada sobre el control del ciclo estral. Estructuralmente es considerada como un ácido graso insaturado, compuesto por 20 átomos de carbono (Echeverría, 2006). Están presentes en todos los tejidos animales desempeñando una variedad de funciones, participando en diversas acciones metabólicas, endocrinas, procesos fisiológicos y patológicos, entre otros (Faria y Gradela, 2010).

Las prostaglandinas difieren de otras hormonas clásicas, su concentración en la circulación sanguínea es muy baja en comparación con esteroides u otras hormonas peptídicas y en la mayoría de los tejidos funcionan como agentes locales potentes, siendo eficaces cerca o en su lugar de producción (Austin y Short, 1979).

La PGF₂α es considerada como el principal agente luteolítico en yeguas, siendo en hembras no gestantes la encargada de controlar la lisis del CL, la cual ocurrirá después de su liberación por las células endometriales entre los días 13 y 16 post ovulación (Faria y Gradela, 2010). Las indicaciones más comunes para su uso

en forma exógena en yeguas no gestantes incluyen, entre otras, las siguientes (Youngquist y Threlfall, 2007): culminación de una fase lútea normal o una fase luteal persistente, sincronización o inducción del estro, inducción de la secreción de gonadotropina (LH) y tratamiento de infecciones uterinas (McKinnon et al., 2011). Otras indicaciones para su uso incluyen inducción de contracciones uterinas debido a sus propiedades ecbólicas (Cuervo-Arango y Newcombe, 2010a), interrupción de preñeces no deseadas (antes y después de la formación de copas endometriales) y finalización de preñez anormal (como ser vesículas trofoblásticas sin un embrión) (Youngquist y Threlfall, 2007).

Las prostaglandinas también juegan un rol crítico en otros aspectos de la fisiología reproductiva de las yeguas incluyendo la ovulación, el pasaje del embrión temprano a través del oviducto, la migración intrauterina del conceptus durante el reconocimiento materno de la preñez, la relajación cervical y la contracción uterina durante el parto (McKinnon et al., 2011).

Se cree que desempeñan un papel obligatorio en la ruptura de la pared del folículo, de hecho, en yeguas, hay razones para creer que la LH (o la hCG exógena) desencadena la ovulación, a través de la regulación de la expresión en la pared del folículo de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2), quien limita la velocidad de síntesis de PG. De hecho, la expresión de esta en la pared del folículo preovulatorio aumenta bruscamente 30-33 hs. después de la inyección de hCG, seguida del aumento de las concentraciones en el líquido folicular tanto de la PGE2 como de la PGF2 α 36-39 hs después de la hCG (McKinnon et al., 2011).

Las prostaglandinas más comúnmente usadas son: Dinoprost y Cloprostenol, siendo el primero una prostaglandina de origen natural y el Cloprostenol un análogo

sintético (Samper et al.,2007). Con respecto a su administración, es igualmente eficaz por vía IM, IV, intrauterina, subcutánea, e intralútea, aunque generalmente se prefiere la vía IM por simplicidad y reducción de efectos secundarios (McKinnon et al., 2011). Se utiliza a una dosis de 5 mg/yegua SC para provocar la regresión del CL entre el día 5 y 16 del ciclo estral, siendo el día 0 la ovulación (Samper, 2009). El tratamiento de yeguas con prostaglandinas resultará en un celo a los 2 a 4 días y provocará una ovulación entre los 7 a 12 días post administración (Neely et al., 1989) con una media de 8 días (Samper, 2009), pudiendo llegar a no ser efectiva durante los primeros 4 a 5 días post ovulación debido a que el CL es refractario a los efectos luteolíticos (Neely et al., 1989); esto último es cuestionado por un estudio más reciente, donde observan que la administración de PGF2 α logra inducir la luteólisis de cuerpos lúteos con una existencia menor a 5 días. Los efectos de la PGF2 α sobre el CL reciente pueden variar dependiendo la dosis, la frecuencia y el momento de la administración (Coffman et al.,2014).

Cuando se administran dosis repetidas antes de los 5 días post-ovulación se afectará la luteogénesis, también dos inyecciones de baja dosis (0,5 mg/yegua IM) espaciadas 12 horas son eficaces y se asocian con menos efectos secundarios (Samper, 2009).

La variabilidad en el tiempo de respuesta está relacionada con el tamaño del FD al momento del tratamiento con PGF (Samper, 2009), estando inversamente correlacionado con el intervalo hasta la ovulación (Burden, McCue y Ferris, 2015). El estado folicular también influye en el intervalo entre el tratamiento con PGF2 α y el inicio del celo y la ovulación. Cuando un folículo grande (30 a 40 mm o más) está presente en el momento de la administración de PGF2 α , se han demostrado diferentes respuestas clínicas. En la mayoría de los casos, las yeguas entran en celo y ovulan

dentro de los 6 días posteriores al tratamiento con PGF2 α , pero en algunos casos la ovulación ocurre dentro de las 24 a 72 horas y la yegua muestra pocos o ningún signo de celo (Youngquist y Threlfall, 2007).

5.0 FALLAS EN LA OVULACIÓN/RESPUESTA A INDUCTORES

El término folículo anovulatorio hemorrágico (HAF), se refiere al fracaso ovulatorio de un folículo preovulatorio, presentando todos los signos típicos asociados a la ovulación como ser el pico de LH, la bajada brusca de E₂ y el aumento gradual de P₄; además de la disminución del edema endometrial y un subsiguiente diestro de duración normal. El desarrollo de estos implica luteinización y hemorragia intrafolicular (sin ruptura), de ahí la referencia a este tipo de folículos anovulatorios como hemorrágicos (Cuervo-Arango y Newcombe, 2012). Su incidencia es de 5% y 20% durante el inicio y el final de la temporada reproductiva respectivamente, son más comunes en yeguas viejas (>20 años), con una incidencia de repetibilidad en el 50% de los individuos y más comúnmente durante la fase folicular tardía (Ginther, Gastal, E. L., Gastal, M. O., y Beg, 2007). Las especies en las cuales ha sido demostrado que este fenómeno se produce de forma natural son las vacas, yeguas y las mujeres (Cuervo-Arango y Newcombe, 2010b).

6.0 HIPÓTESIS

El acetato de histrelina y la hCG son igualmente eficaces en inducir la ovulación en la yegua en programas comerciales de reproducción equina en el Uruguay.

7.0 OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir con el conocimiento para mejorar la eficiencia reproductiva de la industria equina en el Uruguay.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar y comparar en yeguas, utilizando como fármacos inductores de la ovulación la hCG y el acetato de histrelina las siguientes variables:

- 1) Tiempo medio de ovulación (horas desde la administración del inductor hasta la ovulación).
- 2) Porcentaje de respuesta de ovulación por época del año en primavera, verano y otoño.
- 3) Porcentaje de de respuesta por edad en yeguas jóvenes (1,5 a 7 años), adultas (8 a 15 años) y viejas (> 15 años de edad).
- 4) Porcentaje de formación de folículos hemorrágicos anovulatorios (HAF).
- 5) Índices de preñez.
- 6) Relación entre el tamaño del folículo mayor al momento de dar la prostaglandina con el número de días que tarda la yegua en alcanzar las condiciones de inducción.

8.0 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Lugar, animales y tiempo

Fueron evaluados registros reproductivos de 353 ciclos estrales de 125 yeguas pertenecientes a un centro de reproducción privado (Laboratorio de Reproducción

Equina Equus), ubicado en el Departamento de Maldonado, Uruguay (34°S, 56°O), durante cuatro temporadas reproductivas (setiembre a mayo) consecutivas (2018-2022). Las yeguas tenían un rango de edad de 1,5 a 24 años, peso corporal entre 360 y 600 kg, condición corporal ≥ 3 (1-5) (Malschitzky, 2001) y eran predominantemente de raza Árabe, Cuarto de milla, Criollo y cruzas. Las yeguas fueron mantenidas a campo, alimentadas con heno de alfalfa, ración balanceada y agua ad-libitum.

8.2 Diseño experimental

Los ovarios, útero y cérvix fueron evaluados mediante palpación y ultrasonografía transrectal (Sonoscape® A5, Shenzhen, China) con un transductor lineal de 5 MHz. Una vez que las yeguas presentaban un folículo preovulatorio de 30 a 33 mm de diámetro pasaban a monitorearse cada 24 horas. Cuando demostraban signos comportamentales de estro, diámetro folicular entre 35 y 40 mm, grado de edema endometrial ≥ 3 (0-4), útero y cérvix relajados, se inducía la ovulación con hCG o acetato de histrelina como parte del manejo reproductivo de la clínica. Los ciclos fueron distribuidos en los siguientes grupos experimentales; G1 (n=119 ciclos): 1500 UI IV de hCG (Chorulon®, MSD Animal Health, São Pablo, Brasil); G2 (n=234 ciclos): 250 μ g acetato de histrelina IM (Sterilin®, Botupharma, São Pablo, Brasil). Veinticuatro horas después de la inducción las yeguas eran evaluadas nuevamente y si no habían ovulado dicho procedimiento se repetía cada 2 y 6 horas hasta detectar la ovulación. Una vez detectada la ovulación las yeguas madres y las donantes de embriones (266 ciclos) eran inseminadas con semen congelado como parte de la rutina de trabajo de la clínica, mientras que las yeguas receptoras (87 ciclos) no eran inseminadas. Las yeguas que ovularon entre las 24 y 48 horas post tratamiento fueron consideradas que

respondieron al inductor. Aquellas que ovularon antes de las 24 horas o después de las 48 horas del tratamiento fueron consideradas como de no respuesta al inductor.

La información recabada incluyó: edad de las yeguas, inductor de ovulación utilizado, fecha y hora de aplicado el inductor, diámetro del folículo dominante y score de edema endometrial al momento del tratamiento, intervalo de tiempo en horas entre el tratamiento y la ovulación, fecha y hora de ovulación, tasa de preñez (flushing a los 8-9 días o diagnóstico por ultrasonografía a los 14 días) y formación de folículos hemorrágicos anovulatorios (HAF). En caso de utilizar prostaglandinas, 250 ug de D-cloprostenol, IM (Dalmaprost-D, Fatro, Bologna, Italia), se registró el tamaño del folículo mayor al momento de la aplicación y los días que tardó la yegua en alcanzar las condiciones de inducción. Las yeguas fueron agrupadas de acuerdo a su edad en tres grupos: jóvenes (1,5 - 7 años; n= 128), adultas (8 – 15 años; n= 117) y viejas (≥ 16 años; n= 96). De los 353 ciclos utilizados en este estudio, 12 ciclos fueron de yeguas sin registro de edad, las cuales fueron excluidas a la hora de evaluar el efecto edad sobre la eficacia de los inductores. El momento de la aplicación del inductor fue categorizado en 3 grupos: primavera (del 23 de septiembre al 23 de diciembre; n= 151), verano (del 23 de diciembre al 23 de marzo; n= 177), otoño (del 23 de marzo al 23 de junio; n= 25).

Para ser incluidas en el estudio, el inductor de la ovulación debió ser aplicado en yeguas que presentaran comportamiento de estro, un solo folículo preovulatorio entre 35 y 40 mm de diámetro (excluyendo las ovulaciones dobles para evitar competencia por el inductor), edema endometrial ≥ 3 (0-4) y haber sido examinadas cada 2 a 6 horas hasta el momento de la ovulación. Fueron utilizados únicamente datos de yeguas cíclicas, que tuvieron al menos una ovulación antes del tratamiento, excluyendo las yeguas en fase transicional.

8.3 Análisis Estadístico

Diferencias entre e intra tratamientos por época del año, edad de las yeguas, tasas de preñez, formación de HAF e intervalo de tiempo entre el tratamiento y la ovulación fueron determinadas utilizando un paquete de software comercial SAS v9.4 (Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). Se realizó estadística descriptiva y tablas de contingencia de Chi-cuadrado y test exacto de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. Las variables categóricas (porcentaje de yeguas que haya ovulado entre las 24 y 48 horas posteriores al tratamiento (respuesta al inductor), formación de HAF y tasas de preñez) fueron comparadas con el test exacto de Fisher o test de Chi-cuadrado de Pearson. Para las variables cuantitativas (horas de ovulación luego de aplicado el inductor) se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Los resultados fueron presentados como medias \pm EE.

9.0 RESULTADOS

El promedio de edad de las yeguas utilizadas fue de $9,8 \pm 0,37$ años (1,5-24). El diámetro promedio del folículo al momento de la inducción fue de $38,3 \pm 0,18$ mm (35-40), el tiempo promedio de respuesta a los inductores independientemente de la época del año, edad de las yeguas y del inductor utilizado fue de $38,7 \pm 0,26$ horas y el porcentaje de respuesta a los inductores a lo largo de las temporadas fue de 79 % (279/353).

La tabla 1 muestra que las yeguas que respondieron al inductor no tuvieron diferencias ($p= 0,2414$) en el tiempo de respuesta (horas desde la inducción a la ovulación) entre el grupo tratado con hCG ($37,22 \pm 3,55$ horas) y el grupo tratado con acetato de histrelina ($39,35 \pm 4,49$ horas). Sin embargo, la ovulación ocurrió dentro de las 24 – 48 horas luego del tratamiento en el 83,3% (195/234) de los ciclos tratados

con acetato de histrelina, mientras que con hCG ocurrió en el 70,6% (84/119) de los ciclos, observándose un mayor porcentaje de respuesta del acetato de histrelina sobre la hCG ($p = 0.0461$) en todas las temporadas.

Tabla 1. *Media \pm EE de horas de respuesta entre el tratamiento y la ovulación y porcentaje de respuesta entre tratamientos*

	Tratamientos	
	hCG (G1)	Histrelina (G2)
Número de ciclos	119	234
Tiempo de respuesta (horas)	37,2 \pm 3,55	39,3 \pm 4,49
Respuesta al inductor (%)	70,6 ^a	83,3 ^b

^{a,b} Valores diferentes dentro de la fila representan diferencias estadísticas ($p < 0,05$)

Para la hCG hubo una menor respuesta ($p < 0.019$) en las yeguas viejas 39,3% (11/28) en comparación con las yeguas adultas 76,1% (35/46) y jóvenes 91,1 % (41/45) (Tabla 2). Las yeguas tratadas con hCG en verano respondieron en un 65,7% (44/67) y en otoño en un 28,6% (2/7), teniendo una respuesta menor ($p < 0,024$) que las tratadas en primavera 82,2% (37/45) (Tabla 3). La respuesta al acetato de histrelina se mantuvo constante tanto para la estación del año ($p = 0,896$): 81,1% (86/106) en primavera; 81,8% (90/110) en verano y 72,2% (13/18) en otoño (Tabla 4), como para la edad de las yeguas ($p = 0,847$): 75,9% (63/83) en yeguas jóvenes; 80,3% (57/71) en adultas y 82,3% (56/68) en viejas (Tabla 5).

Tabla 2. *Porcentaje de respuesta (tasa de ovulación) a la hCG por intervalo de tiempo en horas y porcentajes de HAF para las yeguas jóvenes, adultas y viejas*

Edad	N°Ciclos	% HAF	% ovulación		
			24-36 h	36-48 h	24-48 h
Joven	45	2,2	16,6	74,5 ^a	91,1 ^a
Adulta	46	6,1	13,3	62,8 ^a	76,1 ^a
Vieja	28	5,6	19,6	19,7 ^b	39,3 ^b

^{a,b} Valores diferentes dentro de las columnas representan diferencias estadísticas ($p < 0,05$)

Tabla 3. *Porcentaje de respuesta (tasa de ovulación) a la hCG por intervalo de tiempo en horas y porcentajes de HAF en primavera, verano y otoño*

Estación	Nº Ciclos	% HAF	% ovulación 24-36 h	% ovulación 36-48 h	% ovulación 24-48 h
Primavera	45	2,2	13,3	68,9	82,2 ^a
Verano	67	6,2	17,9	47,8	65,7 ^b
Otoño	7	28,6	0,0	28,6	28,6 ^b

^{a,b} Valores diferentes dentro de las columnas representan diferencias estadísticas ($p < 0,05$)

Tabla 4. *Porcentaje de respuesta (tasa de ovulación) al acetato de histrelina por intervalo de tiempo en horas y porcentajes de HAF en primavera, verano y otoño*

Estación	Nº Ciclos	% HAF	% ovulación 24-36 h	% ovulación 36-48 h	% ovulación 24-48 h
Primavera	106	5,4	8,9	71,4	81,1
Verano	110	1,8	15,9	66,4	81,8
Otoño	18	0,0	5,6	66,6	72,2

Tabla 5. *Porcentaje de respuesta (tasa de ovulación) al acetato de histrelina por intervalo de tiempo en horas y porcentajes de HAF para yeguas jóvenes, adultas y viejas.*

Edad	Nº Ciclos	HAF (%)	% ovulación 24-36 h	% ovulación 36-48 h	% ovulación 24-48 h
Joven	83	3,6	9,6	66,3	75,9
Adulta	71	1,4	9,9	70,4	80,3
Vieja	68	5,9	14,7	67,6	82,3

El porcentaje de respuesta al inductor en las yeguas viejas fue mayor ($p < 0,0001$) para el acetato de histrelina 82,3% (56/68) que para la hCG 39,3% (11/28), no habiendo diferencias significativas ($p = 0,896$) en el porcentaje de yeguas que ovularon entre las 24 y 48 horas para las yeguas jóvenes con hCG 91,1% (41/45) y

con acetato de histrelina 75,9% (63/83), ni entre las yeguas adultas con hCG 76,2% (35/46) y con acetato de histrelina 80,3% (57/71) (Tabla 6).

Tabla 6. *Porcentaje de respuesta (tasa de ovulación) entre las 24-48 horas entre el acetato de histrelina y la hCG para las yeguas jóvenes, adultas y viejas*

Inductor	Nº ciclos	Edades		
		Jóvenes	Adultas	Viejas
Histrelina	222	75,9% (n=83)	80,3% (n=71)	82,3% ^a (n=68)
hCG	119	91,1% (n=45)	76,2% (n=46)	39,3% ^b (n=28)

^{a,b} Valores diferentes dentro de las columnas representan diferencias estadísticas ($p < 0,0001$)

El acetato de histrelina fue más efectivo ($p < 0,0071$) que la hCG en inducir la ovulación durante los meses de verano con una respuesta del 81,8% (90/110) y 65,7% (44/67) para el acetato de histrelina y hCG respectivamente, y también en otoño con una respuesta de 72,3% (13/18) y 28,6% (2/7) para el acetato de histrelina y hCG respectivamente. No hubo diferencias estadísticas ($p = 0,836$) en el porcentaje de respuesta entre los grupos de yeguas tratadas con hCG 82,2% (37/45) y con el acetato de histrelina 81,1% (86/106) en los meses de primavera (Tabla 7).

Tabla 7. *Porcentaje de respuesta (tasa de ovulación) entre las 24-48 horas entre el acetato histrelina y la hCG en primavera, verano y otoño*

Inductor	Nº ciclos	Estación del año		
		Primavera	Verano	Otoño
Histrelina	234	81,1% (n=106)	81,8% ^a (n=110)	72,3% ^a (n=18)
hCG	119	82,2% (n=45)	65,7% ^b (n=67)	28,6% ^b (n=7)

^{a,b} Valores diferentes dentro de las columnas representan diferencias estadísticas ($p < 0,0071$)

El porcentaje de formación de folículos anovulatorios hemorrágicos (HAF) no varió con el inductor, ni con la edad de las yeguas, observándose una tendencia ($p =$

0,084) a una mayor incidencia de HAF en el otoño (8,0%) que en la primavera y verano independientemente del inductor utilizado (Tabla 8 y 9).

Tabla 8. *Incidencia (%) de folículos hemorrágicos anovulatorios (HAF) en relación a la edad de las yeguas*

Edad	Nº ciclos	HAF (%)
Joven	128	3,1
Adulta	127	3,3
Vieja	86	5,8

Tabla 9. *Incidencia (%) de folículos hemorrágicos anovulatorios (HAF) en relación a las estaciones del año*

Estación	Nº ciclos	HAF (%)
Primavera	157	4,5
Verano	171	3,3
Otoño	25	8,0*

Asterisco (*) Representa una tendencia ($p < 0,084$) entre las estaciones del año

Con respecto a la tasa de preñez no hubo diferencias ($p = 0,4259$) entre los inductores evaluados, 49% (90/184) para el acetato de histrelina y 45% (37/82) para la hCG (Tabla 10). Tampoco se apreció un efecto estación del año, ni un efecto edad sobre las tasas de preñez (Tabla 11).

Para la prostaglandina (PG) observamos que a mayor tamaño folicular al momento de administrar la PG, menos días en promedio se tarda en alcanzar las condiciones de inducción y ovular (Tabla 12).

Tabla 10. *Tasas promedio de preñez (%) para la hCG y acetato de histrelina durante las cuatro temporadas reproductivas*

Inductor	Nº ciclos	Tasa de Preñez
----------	-----------	----------------

Histrelina	184	49
hCG	82	45

Tabla 11. *Tasas de preñez (%) para la hCG y acetato de histrelina en las yeguas jóvenes, adultas y viejas y para los meses de primavera, verano y otoño*

Inductor	Tasa de preñez					
	Joven	Adulta	vieja	primavera	verano	otoño
Histrelina	52,7	42,8	50,0	52,9	43,5	50,0
hCG	56,0	40,0	33,3	35,8	54,0	50,0

Tabla 12. *Relación entre el tamaño del folículo mayor al momento de aplicar la prostaglandina y los días promedio, mínimos y máximos en alcanzar las condiciones de inducción de la ovulación en la yegua*

Diámetro Folicular (mm)	Días	Min	Max
<20	7,1	4	15
20-25	5,4	3	12
26-31	4,3	2	10
32-37	3,2	1	8
>37	2,5	1	8

10. DISCUSIÓN

Éste es el primer trabajo que evalúa el uso de inductores de la ovulación en yeguas en nuestro territorio y para nuestras condiciones de campo. El acetato de histrelina es de los análogos menos estudiados y hay pocos trabajos que lo comparen con la hCG. Tampoco existen estudios que evalúen el efecto edad de la yegua y estación del año al momento de aplicar histrelina sobre los índices de respuesta al

inductor. Este estudio se basó en registros reproductivos de una práctica privada que se dedica principalmente a la IA con semen congelado y a la transferencia de embriones en Uruguay.

La ovulación en la yegua sin ningún manejo hormonal ocurre en promedio 75 horas luego que el folículo preovulatorio alcanza los 35 mm de diámetro dependiendo de la edad, raza y época del año (Farquhar et al., 2002; Silva et al., 2016; Jardim et al., 2020). El presente trabajo constató que ambos inductores fueron eficaces en acelerar la ovulación en la mayoría de las yeguas dentro de las 48 horas post-tratamiento, en hembras en celo, con folículos entre 35 y 40 mm de diámetro y edema uterino, lo que coincide con lo visto por diversos autores (Meinert et al., 1993; Mumford et al., 1995; Farquhar et al., 2000; McCue et al., 2007; Voge et al., 2012; Kiser et al., 2013; Silva et al., 2016; Chopin et al., 2020). El acetato de histrelina (media: 39 horas) y la hCG (media: 37 horas) son efectivos para inducir la ovulación en yeguas dentro de las 24 - 48 horas post-tratamiento con un predominio dentro de las 36 - 48 h; no detectándose una diferencia significativa entre ambas en las horas promedio de ovulación en las yeguas que respondieron al inductor. En un trabajo realizado por Chopin et al., (2020) quien comparó el tiempo de ovulación en días en yeguas Cuarto de milla y Australian Stock, con hCG, acetato de deslorelina, acetato de histrelina y hCG + acetato de deslorelina, tampoco hubo diferencias significativas entre los inductores, pero sí con el grupo control al cual se le administró suero fisiológico; siendo para este ($4,05 \pm 1,61$ días) y para los grupos tratados (acetato de histrelina $1,88 \pm 0,49$; hCG $2,21 \pm 0,71$; acetato de deslorelina $2,36 \pm 1,5$; combinación hCG- acetato de deslorelina $1,89 \pm 0,31$ días). Por otro lado, un trabajo realizado por Oliveira et al., (2020), en el cual se evaluó la eficacia del acetato de histrelina y la hCG en burras obtuvieron como resultado que el 100% de las burras tratadas con acetato de histrelina

y el 90% de las tratadas con hCG ovularon dentro del rango esperado (36 - 48 horas post inducción); una sola de las burras tratada con hCG ovuló antes de las 36 horas posteriores a la inducción de la ovulación. Esta diferencia podría atribuirse al hecho de que se utilizaron solamente 10 animales y en un rango de edad menor al nuestro (de 3,5 a 12 años).

Nuestros resultados conciben con los de Voge et al., (2012), quienes compararon la eficacia de 2 dosis de acetato de histrelina con hCG. El uso de 1000 o 500 ug de acetato histrelina resultó ser al menos igual de eficaz que el tratamiento con hCG para inducir la ovulación dentro de los 2 días de tratamiento durante el inicio de la temporada reproductiva.

Algunos autores (Barbacini et al., 2000 y McCue et al., 2004) observaron un efecto negativo del aumento de la edad de las yeguas sobre la respuesta ovulatoria a la hCG. Al igual que en el presente trabajo, Barbacini et al., (2000) realizó un estudio retrospectivo a lo largo de 5 años, evaluando 559 yeguas y 1040 ciclos, encontrando que en yeguas viejas (>16 años) a las cuales se les aplicó hCG tuvieron una mayor dispersión en el intervalo de tiempo a la ovulación y una menor eficacia de respuesta que las yeguas más jóvenes. En este trabajo, observamos una diferencia en el porcentaje de respuesta de las yeguas a favor del acetato de histrelina sobre la hCG, dándose esta diferencia en las yeguas viejas y en los meses de verano y otoño, lo cual concuerda con el trabajo de Barbacini et al., (2000) quienes también vieron una menor respuesta a la hCG en la estación reproductiva tardía.

En cambio, estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Jardim et al., (2020) quienes obtuvieron una menor respuesta del acetato de histrelina (64%) comparada con la hCG (100%) a las 48 horas post-tratamiento. Esto podría

adjudicarse al hecho de que Jardim et al., (2020) realizaron el estudio solo en la raza Manga Larga Marchador, no especificando la distribución por edad de las yeguas (% yeguas viejas), ni los meses del año en los cuales fue realizado el estudio. Seguramente utilizaron un número bajo de yeguas viejas (>16 años), sumado que el trabajo fue realizado en Río de Janeiro, la cual se encuentra a una latitud más cercana a la línea del ecuador que Uruguay, presentando una menor variación estacional. Esto podría explicar en parte las diferencias con nuestros resultados.

La menor respuesta de las yeguas a la hCG en los meses de verano y otoño podría deberse a una combinación de cambios estacionales en la función de la pituitaria y/o en la competencia folicular. Descartamos el hecho de que estas diferencias se debieran a una menor eficacia del inductor por haber recibido más de 2 dosis de hCG en la misma temporada (Wilson et al., 1990; McCue et al., 2004; Green et al., 2007; Serres et al., 2010) ya que sólo un 2,8 % (10/353) de los ciclos y solo 5 yeguas (4%) recibieron 3 o más aplicaciones de hCG en la misma temporada. Además, 4 de estas 5 yeguas respondieron al inductor sin observarse alteraciones, sólo en una de ellas se observó un efecto detrimental en la respuesta a la hCG con las sucesivas aplicaciones, adjudicándose a un problema individual del animal y no a un efecto de la producción de anticuerpos contra hCG, lo que se condice con otros estudios donde no se encontró un efecto negativo con aplicaciones repetidas de bajas dosis intravenosas de hCG en la misma yegua en la misma temporada (Barbacini et al., 2000; Blanchard et al., 2003; Gastal et al., 2006) por lo que es un tema controvertido en la literatura. La menor eficacia de la hCG en las yeguas viejas podría deberse a trastornos metabólicos o inmunitarios inherentes de la edad que alteren la bioactividad de la hCG y/o su biodisponibilidad.

Otro de los datos obtenidos fue el porcentaje de formación de folículos anovulatorios hemorrágicos (HAF). La incidencia de HAF no tuvo relación con el inductor de la ovulación utilizado, no habiendo diferencias entre la histrelina y la hCG en la formación de folículos anovulatorios. Tampoco encontramos diferencias estadísticas entre las yeguas viejas (5,8 %) y las yeguas jóvenes (3,2%), observándose una tendencia a un mayor porcentaje de HAF en el otoño (8,0%) que en primavera (4,5%) y verano (3,3%). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Chopin y colaboradores (2020) quienes no tuvieron diferencia en la incidencia para los diferentes inductores evaluados, coincidiendo además este con Ginther y Gastal (2007) que al igual que nosotros observó que la formación de HAF es más común y presenta un mayor porcentaje en la transición de otoño.

Con respecto a las tasas de preñez (TP) no hubo diferencias entre los inductores estudiados, coincidiendo con Ferreira-Silva et al., (2018) quienes evaluaron el efecto de la hCG y un análogo de GnRH (acetato de buserelina) sobre las TP no encontrando diferencias entre estos. Lo mismo ocurrió en un trabajo realizado por Segabinazzi et al., (2021) quien realizó un estudio retrospectivo durante las temporadas reproductivas 2015-2018 en el hemisferio norte (EEUU), en el que comparó hCG y un análogo de GnRH (acetato de deslorelina), observándose que el uso de estos o su combinación no modifica las tasas de preñez en yeguas receptoras después de la TE.

Para el uso de prostaglandina observamos una relación inversamente proporcional entre el tamaño del folículo mayor al momento de aplicar la PG y el tiempo en días que tarda la yegua en alcanzar las condiciones para poder inducir la ovulación y ovular. Esto concuerda con Newcombe et al., (2008) quienes vieron una

correlación negativa entre el diámetro folicular y el intervalo entre el tratamiento y la ovulación.

En resumen, el presente estudio demuestra que a lo largo de cuatro temporadas reproductivas completas y en yeguas con diferentes edades, el porcentaje de ovulación entre las 24 y 48 horas es mayor con acetato de histrelina que con hCG. No hubo diferencias en la formación de HAF, ni en las tasas de preñez entre los inductores. La hCG fue más eficaz en inducir la ovulación al principio de la temporada, en los meses de primavera, que al final de la temporada reproductiva durante los meses de verano y otoño. El acetato de histrelina fue más efectivo que la hCG en inducir la ovulación en yeguas viejas y en las estaciones de verano y otoño, no encontrándose diferencias en primavera. En conclusión, el acetato de histrelina es más eficaz que la hCG para inducir la ovulación en yeguas viejas (>15 años) y al final de la estación reproductiva (verano-otoño).

11. CONCLUSIÓN

- Tanto la gonadotropina coriónica humana (hCG) como el acetato de histrelina indujeron la ovulación dentro de las 48 horas post-tratamiento, viéndose un predominio en el rango de las 36-48 horas.
- El acetato de histrelina tuvo mayor porcentaje de respuesta que la hCG a lo largo de la temporada reproductiva y en yeguas de diversos grupos etarios. Para la hCG hubo una menor respuesta en yeguas viejas (>15 años) y en los meses de verano y otoño.
- No hubo diferencias en la formación de folículos anovulatorios hemorrágicos (HAF) entre la hCG y el acetato de histrelina.
- La tasa de preñez (TP) no presentó diferencias entre los inductores estudiados.

- Hay una relación inversamente proporcional entre el tamaño del folículo mayor al momento de aplicar la prostaglandina y el intervalo de tiempo en alcanzar las condiciones necesarias para inducir la ovulación.

12. CONSIDERACIONES FINALES

Las fortalezas de nuestro trabajo son la cantidad de yeguas y ciclos evaluados y la cantidad de temporadas, ya que al evaluar un número grande de animales y ciclos de diversas razas y grupos etario y a lo largo de toda la temporada reproductiva nos permite mejorar la confianza de los resultados y sacar conclusiones de nuestro sistema productivo. La mayoría de los trabajos consultados para la realización de esta tesis utilizaron cantidad de animales notoriamente menores. Por otro lado, al haberse estudiado 4 temporadas consecutivas se pudo evaluar mejor cómo se comporta el inductor a medida que se avanza en la temporada. Otro factor a destacar es el rango de edades y su distribución equitativa, permitiendo ver la eficiencia del mismo en diferentes momentos de la vida reproductiva del animal. Otra de las fortalezas es que al evaluar un programa de IA y TE con semen congelado nos permitió tener un control más preciso del momento de la inducción y de la ovulación. Nos hubiese gustado tener un grupo control sin tratamiento para complementar el estudio, permitiéndonos así comparar los resultados obtenidos con lo que hubiera ocurrido naturalmente, sin la administración de un inductor para: las horas desde que un folículo alcanza un tamaño preovulatorio y ovula, la formación de HAF y la TP. Por último, resaltar que es el primer trabajo que evalúa las drogas utilizadas en nuestro país y en condiciones productivas y razas criadas en el Uruguay; siendo un estudio retrospectivo que aporta datos útiles para el veterinario clínico de campo y para el estudio de los inductores, en especial

del acetato de histrelina para el cual no hay tantos trabajos en la literatura como de otros análogos de GnRH.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acosta, T., y Miyamoto, A. (2004). Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 127–140.
2. Andrade Souza, F., Pérez Osorio, J., D`Oliveira-Sousa, A., do Vale Filho, V.R., Marc, H., Chacón, J. L., y Arias, S.A. (2011). Foliculogénesis y ovulación en la especie equina. *Rev Med Vet.* (22): 43-50.
3. Ángel, D., y Bran, J.A. (2010). Reproducción asistida en equinos: aportes desde la teoría. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 5(1) ,56-69.
4. Armstrong, D.T., Xia, P., de Gannes, G., Tekpetey, F. R., y Khamsi, F. (1996). Differential effects of insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone on proliferation and differentiation of bovine cumulus cells and granulosa cells. *Biology of reproduction*, 54(2), 331–338.
5. Aurich, C. (2011). Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science*, 124(3-4), 220–228. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.02.005
6. Austin, C. R., y Short, R. V.. (1979). *Reproduction in Mammals Book 7: Mechanisms of Hormone Action*. Cambridge University Press, London.
7. Bashir, S. T., Ishak, G. M., Gastal, M. O., Roser, J. F., y Gastal, E. L. (2016). Changes in intrafollicular concentrations of free IGF-1, activin A, inhibin A, VEGF, estradiol, and prolactin before ovulation in mares. *Theriogenology*, 85(8), 1491–1498.

8. Barbacini, S., Zavaglia, G., Gulden, P., Marchi, V., y Necchi, D. (2000). Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. *Equine veterinary education*, 12(6), 312-332.
9. Bartoli, E. L. (2009). *Uso de Gonodotrofina Coriônica Humana no Controle Reprodutivo de Éguas*. (Trabalho de conclusão de curso). Centro Universitário FMU, São Paulo.
10. Beal, J., Rubin, M.I. B., La Corte, F. D., Oliveira, L.S. S., Silva, J. H. S., y Silva, C. A. M. (2011). Indução da ovulação com gonadotrofina coriônica humana em éguas Crioulas / Ovulation induction with human chorionic gonadotropin in criollo mares. *Braz. j. vet. res. anim. sci* ; 48(4): 332-335.
11. Benammar, A., Derisoud, E., Vialard, F., Palmer, E., Ayoubi, J.M., Poulain, M., y Chavatte-Palmer, P. (2021). *The Mare: A Pertinent Model for Human Assisted Reproductive Technologies?* *Animals* (Basel). 11(8):2304. doi: 10.3390/ani11082304
12. Bloom, W., y Fawcett, D.W. (1992). *Tratado de Histología*. 11ª Edición. México: Editorial Interamericana, McGraw-Hill.
13. Boakari, Y.L. (2014). *Efeito da hCG ou deslorelina sobre a hemodinâmica folicular e perfil endógeno de LH em éguas cíclicas*. (Dissertação Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
14. Boerboom, D., Brown, K. A., Vaillancourt, D., Poitras, P., Goff, A. K., Watanabe, K., y Sirois, J. (2004). Expression of key prostaglandin synthases in equine endometrium during late diestrus and early pregnancy. *Biology of reproduction*, 70(2), 391-399.

15. Boeta, M., Balcázar, A., Cerbón, J.L., Hernández Medrano, J.H., Hernández Cerón, J.,...Zarco, L. (2018). *Fisiología reproductiva de los animales domésticos*. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 542p.
16. Bohlen, J.F. (2014). Understanding Reproductive Events in the Mare for Successful Breeding Programs. Department of Animal and Dairy Science .
17. Brinsko, S. P. (2006). Insemination doses: How low can we go? *Theriogenology*, 66(3), 543–550. doi:10.1016/j.theriogenology.2006
18. Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C.C., Hinrichs, K., y Hartman, D.L. (2011). *Manual of Reproduction*. (3 ed.) Elsevier Health Sciences. 325 p.
19. Burden, C. A., McCue, P. M., y Ferris, R. A. (2015). Effect of Cloprostenol Administration on Interval to Subsequent Ovulation and Anovulatory Follicle Formation in Quarter Horse Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(6), 531–535. doi:10.1016/j.jevs.2015.02.011
20. Campbell, M. (2012). It's all in the timing: ovulation induction in the mare. *Veterinary Record*, 170(21), 538–539. doi:10.1136/vr.e3552
21. Camps, F. (2006). *Qué es Transplante Embrionario*. Producción animal. Recuperado de: https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/15-transplante_embriionario_equino.pdf
22. Carleton, C. L. (2011). *Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult Clinical Companion*. John Wiley & Sons.
23. Coffman, E. A., Pinto, C. R. F., Snyder, H. K., Leisinger, C. A., Cole, K., y Whisnant, C. S. (2014). Antiluteogenic effects of serial prostaglandin F2 α

- administration in cycling mares. *Theriogenology*, 82(9), 1241–1245.
doi:10.1016/j.theriogenology.2014.07.038
24. Conn, P. M., y Crowley, W.F. (1994). Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annual Review of Medicine*, 45(1), 391–405.
doi:10.1146/annurev.med.45.1.391
25. Correa, L.M., y Fernández, J.L. (2017). Influencia de la melatonina sobre la fisiología y la conducta de los ungulados. *Revista De Investigaciones Altoandinas*, 19(3), 337-350.
26. Cortés-Vidauri, Z., Aréchiga-Flores, C., Rincón-Delgado, M., Rochín-Berumen, F., López-Carlos, M., y Flores-Flores, G. (2018). Revisión: El Ciclo Reproductivo de la Yegua. *Abanico Veterinario*. 8(3):14-41.
27. Cuervo-Arango, J., y Newcombe, J. R. (2010a). Cloprostenol in equine reproductive practice: something more than a luteolytic drug. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(5), e8-e11.; doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01508.x
28. Cuervo-Arango, J., y Newcombe, J. R. (2010b). Risk factors for the development of haemorrhagic anovulatory follicles in the mare. *Reproduction in domestic animals*, 45(3), 473-480.
29. Cuervo-Arango, J., y Newcombe, J. R. (2012). Ultrasound characteristics of experimentally induced luteinized unruptured follicles (LUF) and naturally occurring hemorrhagic anovulatory follicles (HAF) in the mare. *Theriogenology*, 77(3), 514-524.
30. Chopin, J. B., Brookes, V. J., Rodger, J., y Gunn, A. (2020). Comparison of human chorionic gonadotropin (hCG), deslorelin, deslorelin combined with hCG, and histrelin to induce ovulation in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*, 89, 103095. doi:10.1016/j.jevs.2020.103095

31. D'Occhio, M., Fordyce, G., Whyte, T., Aspden, W., y Trigg, T. (2000). Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 433–442. doi:10.1016/s0378-4320(00)00078-6
32. Douglas-Hamilton, D. H., Osol, R., Osol, G., Driscoll, D., y Noble, H. (1984). A field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology*, 22(3), 291–304.
33. Duran Graeff, M.C. (2007). “Efecto de la inducción de ovulación con gonadotropina coriónica humana, sobre la concentración plasmática de progesterona al inicio de la preñez en yeguas fina sangre de carrera “. (Tesis de grado). Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago.
34. Dyce, K.M., Sack, W.O., y Wensing, C.J.G. (2002). Capítulo 22: Pelvis y órganos reproductivos del caballo. En: *Anatomía Veterinaria*. (3ra ed., pp. 605-630). Elsevier.
35. Echeverría, J.(2006). Endocrinología Reproductiva: Prostaglandina F2a en vacas. Revisión bibliográfica REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*, vol. VII, núm. 1, pp. 1-12 Veterinaria Organización. Málaga, España.
36. England, G. (2007). *Fertility and obstetrics in the horse*. (3ra ed.) Wiley InterScience.
40. Espinoza Villavicencio, J.L., Ortega Pérez, R., Palacios Espinosa, A., Valencia Méndez, J., y Aréchiga Flores, C.F. (2007). Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: Una revisión. *Interciencia*, 32(2),93-99. ISSN: 0378-1844. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33932204>

41. Evans, J.W., Roser, J.F., y Mikuckis, G.M. (1982). Comparison of the interaction of equine LH and human chorionic gonadotrophin to equine testicular receptors. *J Reprod Fertil Suppl.* 1982;32:113-21. PMID: 6300387.
42. Faria, D.R., y Gradela, A. (2010). Hormonioterapia aplicada à ginecologia eqüina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* v.34, n.2, p.114-122. Belo Horizonte, Brasil.
43. Farias, L.D., Neves, A.P., Fiala Rechsteiner, S.M., y Tarouco, A.K. (2016). Indução da ovulação em éguas: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* 40 (1), 17-21.
44. Farquhar, V. J., McCue, P. M., Vanderwall, D. K., y Squires, E. L. (2000). Efficacy of the GnRH agonist deslorelin acetate for inducing ovulation in mares relative to age of mare and season. *Journal of Equine Veterinary Science,* 20(11), 722-725
45. Farquhar, V.J., McCue, P.M., Nett, T.M., y Squires, E.L. (2001). Effect of deslorelin acetate on gonadotropin secretion and ovarian follicle development in cycling mares. *J Am Vet Med Assoc* 2001;218:749–752..
46. Farquhar, V. J., Mccue, P. M., Carnevale, E. M., Nett, T. M., y Squires, E. L. (2002). Deslorelin acetate (Ovuplant) therapy in cycling mares: effect of implant removal on FSH secretion and ovarian function. *Equine Veterinary Journal,* 34(4), 417–420. doi:10.2746/042516402776249227
47. Ferrari A., Mayid S., Perez F., Lopez D., y Recuero, M. (2012). *Caracterización y potencialidades del sector ecuestre en Uruguay.* Uruguay XXI. 150p. Recuperado de: <https://www.uruguayxxi.gub.uy/uploads/informacion/5237b4387eb33874ada98cc63615189d1f8f6f2f.pdf>

48. Ferreira-Silva, J.C., Nascimento, P.S., Moura, M.T., Lima Basto, S.R., Vasconcelos Azevedo. M., Motta Rocha, J.,... Lemos Oliveira, M.A.(2018). Induction of Ovulation in Mangalarga Marchador Mares by hCG or GnRH. *Acta Scientiae Veterinariae*. 46: 1536
49. Ferris, R. A., Hatzel, J. N., Lindholm, A. R. G., Scofield, D. B., y McCue, P. M. (2012). Efficacy of Deslorelin Acetate (SucroMate) on Induction of Ovulation in American Quarter Horse Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(5), 285–288. doi:10.1016/j.jevs.2011.11.007
50. Figueiredo, T., Paiva, R., Kozicki, L. E., Kaercher, F., Weiss, R. R., Dos Santos, I. W., y Muradas, P. R. (2011). Induction of ovulation in quarter horse mares through the use of deslorelin acetate and human chorionic gonadotrophin (hCG). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(3), 517–521.
51. Filipiak, Y., Viqueira, M., y Bielli, A. (2016). Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. *Veterinaria* (Montevideo), 52(202), 2.
52. Gigli, I., Russo, A., y Agüero, A. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *InVet*, 8(1), 183-203.
53. Ginther, O. J., y Bergfelt, D. R. (1990). Effect of GnRH treatment during the anovulatory season on multiple ovulation rate and on follicular development during the ensuing pregnancy in mares. *Reproduction*, 88(1), 119-126.
54. Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O., y Beg, M.A. (2004). Seasonal influence on equine follicle dynamics. *Anim Reprod* 1:31-44.
55. Ginther, O. J., Gastal, E. L., Gastal, M. O., y Beg, M. A. (2007). Incidence, endocrinology, vascularity, and morphology of hemorrhagic anovulatory follicles in mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 27(3), 130-139.

56. Ginther, O. J. (2012). The end of the tour de force of the corpus luteum in mares. *Theriogenology*, 77(6), 1042–1049.
57. Ginther, O. J., y Beg, M. A. (2012). Dynamics of circulating progesterone concentrations before and during luteolysis: a comparison between cattle and horses. *Biology of reproduction*, 86(6), 170-1.
58. Greco, G. M. (2016). Eficiência de diferentes agentes indutores da ovulação e associações sobre as características uterinas, ovarianas e concentrações plasmáticas de LH em éguas. (Tesis de doctorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP.
59. Green, J.M., Raz,T., Epp,T., Carley, S.D., y Card, C.E. (2007). *Relationships between utero-ovarian parameters and the ovulatory response to Human Chorionic Gonadotrophin (hCG) in mares*. Conference: 53rd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. Orlando, Florida, USA.
60. Heilenkotter, D.C. (2015). *“Aspiración folicular transvaginal ecoguiada en yeguas”*. (Tesis de grado). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
61. Hernández C.J., y Zarco Quintero, L.A. (1998). Función del cuerpo lúteo y muerte embrionaria en rumiantes. *Revista Ciencia Veterinaria*. Vol. 8
62. Hyland, J. H. (1993). Uses of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) and its analogues for advancing the breeding season in the mare. *Animal Reproduction Science*, 33(1-4), 195–207. doi:10.1016/0378-4320(93)90115-8
63. Intervet. (2007). *Compendio de Reproducción Animal*. (9a ed) .Sinervia, Uruguay-Paraguay.

64. Jaramillo Londoño, M., y Pérez Mayor, J.F. (2013). “*Evaluación del folículo preovulatorio y efecto del deslorelin como inductor de la ovulación en 12 yeguas silla argentina en el municipio de Facatativá, Cundinamarca*”. (Tesis de Grado). Facultad De Ciencias Agropecuarias, Universidad De La Salle, Bogotá.
65. Jardim, C. C., Ferraz, P. J., Gomes, D. R., Sá, M. A. F., Frazier, L. K., Dutra, G. A., ... Jacob, J. C. F. (2020). Use of different ovulation inductors in equine. *Journal of Equine Veterinary Science*, 89, 103094. doi:10.1016/j.jevs.2020.103094
66. Kino, S., Osawa, T., Mizuno, S., Watanabe, G., Taya, K., y Izaike, Y. (2014). Effect of postbreeding intramuscular administration of deslorelin acetate on plasma LH and progesterone concentrations and conception rate in mares. *Journal of equine science*, 25(1), 23-27.
67. Kiser, A. M., Sudderth, A. K., Brinsko, S. P., Burns, P. J., Douglas, R. H., y Blanchard, T. L. (2013). Comparison of efficacy of two dose rates of Histrelin for inducing ovulation in broodmares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(10), 820-822.
68. König, H.E., Liebich, H.G. (2013). Órganos genitales femeninos. En König, H.E., Liebich, H.G., y Bragulla, H. *Anatomía de los animales domésticos*. (2da ed., pp. 135-151). Madrid: Ed. Médica Panamericana.
69. La Paz, M.N., Fonseca V.U., Campos, D.B., Artoni, L.P., Sousa, L.M.M.C., y Papa, P.C. (2007). Produção de progesterona in vitro pelas células do corpo lúteo bovino ao longo da gestação. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 27(9):370376.

70. Lanuza, G. (1999). “*Regulación del desarrollo folicular por factores peptídicos intraováricos*”. (Tesis de Grado). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
71. Lazcano, S., y Pereyra, F. (2020). “*Semen congelado en equinos: influencia del sitio y la dosis de inseminación sobre el transporte espermático y la respuesta inflamatoria*”. (Tesis de Grado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
72. LeBlanc, M.M. (1998). Enfermedades del aparato reproductivo: La yegua. En: Colahan, P.T., Mayhew, I.G., Merrit, A.M., y Moore, J.N. *Medicina y Cirugía Equina*. (4a ed). Inter.-Médica. Buenos Aires, Argentina. pp. 869 – 989.
73. Lema Veloz, M.I. (2017). “*Análisis de la expresión del gen metionina sulfóxido reductasa a (msra) en células foliculares bovinas en diferentes estadios*”. (Tesis de Grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Pecuarias, Ecuador.
74. Lindholm, A. R. G., Ferris, R. A., Scofield, D. B., y McCue, P. M. (2011). Comparison of deslorelin and histrelin for induction of ovulation in mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31(5-6), 312–313. doi:10.1016/j.jevs.2011.03.144
75. Lopez Mazz, C.R. (2009). “*Efecto de la administración de una solución neoglucogénica sobre la foliculogénesis y la tasa ovulatoria en ovejas Corriedale en pastoreo*”. (Tesis de Maestría). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
76. Losinno, L., y Aguilar, J. (2002). *Reproducción y biotecnologías en la producción equina*. Cátedra de Producción Equina, Depto. Producción Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. Recuperado de: <https://www.produccion->

animal.com.ar/produccion_equinos/curso_equinos_l/14-
reproduccion_y_biotecnologias.pdf

77. Luz, M.R. (2004). *“Função luteal e luteólise em cadelas: aspectos morfofuncionais”*. (Tesis de Doctorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, SP.
78. Malschitzky, E., Schilela, A., Meirelles, L. S., Mattos, A. L. G., Gregory, R. M., y Mattos, R. C. (2001). Artificial photoperiod in pregnant mares and its effect on pregnancy length and postpartum reproductive performance. *Pferdeheilkunde*; 17(6): 565-569.
79. McCue, P. M. (1996). Superovulation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 12(1), 1–11. doi:10.1016/s0749-0739(17)30291-2
80. McCue, P. (2000). Recent Advances in equine reproductions, B.A. *International Veterinary Information Service (IVIS)*. Ball (Ed). Ithaca. New York. US. pp 1-6[2]
81. McCue, P.M. (2003). Induction of ovulation in: Robinson N.E, Eds. *Current therapy in equine medicine*. 5ta ed. Philadelphia: Saunders; pp 240- 242.
82. McCue, P., Hudson, J.J., Bruemmer, J. E., y Squires, E.L. (2004). Efficacy of hCG at inducing ovulation: A new look at an old issue. *Proceedings of the 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners* (pp. 510-513). Lexington: AAEP.
83. McCue, P. M., Magee, C., y Gee, E. K. (2007). Comparison of Compounded Deslorelin and hCG for Induction of Ovulation in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 27(2), 58–61. doi:10.1016/j.jevs.2006.12.003

84. McCue, P. M., Logan, N. L., y Magee, C. (2007). Management of the transition period: physiology and artificial photoperiod. *Equine Veterinary Education*, 19(3), 146–150.
85. McKinnon, A., Squires, E.L., Vaala, W.E., y Varner, D.D. (2011). *Equine reproduction*. United Kingdom: Wiley-Blackwell.
86. Meinert, C., Silva, J. F. S., Kroetz, I., Klug, E., Trigg, T. E., Hoppen, H. O., y Jöchle, W. (1993). Advancing the time of ovulation in the mare with a short-term implant releasing the GnRH analogue deslorelin. *Equine Veterinary Journal*, 25(1), 65–68. doi:10.1111/j.2042-3306.1993.tb02904.x
87. Melo, C. M., Papa, F. O., Puoli Filho, J. N. P., Araujo, G. H. M., Dell'aqua Junior., J. A., Alvarenga, M. A. (2012). Eficiência do acetato de deslorelina e do extrato de pituitária eqüina na indução da ovulação em éguas. *Veterinária e Zootecnia*, v. 19, p. 392-398.
88. Mihm, M., y Bleach, E.C.L. (2003). Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science*, 78, 217-237.
89. Morel, M. C. G. D. (2008). *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. (3ra ed). CABI.
90. Morel, M. C. G. D., y Newcombe, J. R. (2008). The efficacy of different hCG dose rates and the effect of hCG treatment on ovarian activity: Ovulation, multiple ovulation, pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulation; in the mare. *Animal Reproduction Science*, 109(1-4), 189–199. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.10.005
89. Morrissey, J., Ferris, R., y McCue, P. (2019). Comparison of deslorelin and histrelin for induction of ovulation in mares. *Clinical Theriogenology* Vol.11 No.2 pp.123-126 ref.14

90. Mumford, E.L., Squires, E.L., Jöchle, E., Harrison, L.A., Nett, T.M., y Trigg, T.E. (1995). Use of deslorelin short-term implants to induce ovulation in cycling mares during three consecutive estrous cycles. *Animal Reproduction Science*, 39, 129-140.
91. Nagy, P., Guillaume, D., y Daels, P. (2000). Seasonality in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 60/61, 245–262.
92. Nagao, J.F., Neves Neto, J.R., Papa, F.O., Alvarenga, M.A., Freitas-Dell'Aqua, C.P., y Dell'Aqua Junior, J.A.(2012). *Induction of double ovulation in mares using deslorelin acetate*. *Animal Reproduction Science*. 136: 69-73. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.015>
93. Neely, D.P., Liu, I.K.M., y Hillman, R.B. (1989). *Reproducción Equina*. Montevideo, Uruguay, Ed. Hemisferio Sur, 178p.
94. Newcombe, J. R., Jöchle, W., y Cuervo-Arango, J. (2008). Effect of Dose of Cloprostenol on the Interval to Ovulation in the Diestrous Mare: A Retrospective Study. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28(9), 532–539. doi:10.1016/j.jevs.2008.07.017
95. Nuñez Pintado, M.J.(2013). “*Receptores de estrógenos alfa en el endometrio de yeguas resistentes a endometritis: vínculo inmuno-endócrino*”. (Tesis de Grado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
96. Oliveira, S. N., Segabinazzi, L. G., Canuto, L., Lisboa, F. P., Medrado, F. E., Dell'Aqua, J. A., ... Papa, F. O. (2020). Comparative efficacy of histrelin acetate and hCG for inducing ovulation in Brazilian Northeastern jennies (*Equus africanus asinus*). *Journal of Equine Veterinary Science*, 103146. doi:10.1016/j.jevs.2020.103146

97. Ovuplant comprimidos para implantación de 2,1 mg para equino (yeguas). (2016). Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. [Prospecto]. Recuperado de <https://botplusweb.portalfarma.com/documentos/2017/3/9/112596.pdf>
98. Palma, G. A. y Brem, G. (2001). *Bioteología de la reproducción*. Instituto nacional de tecnologías agropecuarias. Argentina.
99. Parrado Soler, A. C., y Fandiño Gomez, J. A. (2019). “*Fotoperiodo y dinámica folicular en yeguas*”. (Tesis de pregrado). Universidad Cooperativa de Colombia, Villavicencio.
100. Pérez Montenegro, J. (2015). “*Evaluación de la capacidad de maduración de oocitos obtenidos en diferentes etapas del desarrollo folicular por medio de aspiración folicular en yeguas*”. (Tesis de Maestría). Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia.
101. Perez Anzures, G.(2019). “*Caracterización de la dinámica ovárica, tiempo de ovulación y fertilidad en yeguas inseminadas*”. (Tesis posgrado). Universidad Autónoma de Chapingo, México.
102. Pickett, B. W., y Voss, J. L. (1975). The effect of semen extenders and sperm number on mare fertility. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, (23), 95–98.[3]
103. Pinto, C.R. (2013).Hormones and Breeding, *AAEP Proceedings, Reproductive Endocrinology*, Vol. 59.
104. Pinto, C., y Frazer, G.S.(2013).Reproduction. En Mair, T., Love, S., Schumacher, J., Smith,R. K. W., y Frazer, G.S. *Equine Medicine, Surgery and Reproduction*. (2da ed). Saunders Ltd.

105. Ramírez, G., Gutiérrez, C., y Ramos, M. (2010). Dinámica folicular en yeguas paso fino colombiano medido por ultrasonografía en la Sabana de Bogotá. *Revista de Medicina Veterinaria*, (19), 21-35.
106. Reynolds, L. P., y Redmer, D. A. (1999). Growth and development of the corpus luteum. *Journal of Reproduction And Fertility-Supplement-*, 181-191.
107. Roberto da Costa, R. P., Branco, V., Pessa, P., Silva, J. R., y Ferreira-Dias, G. (2005). *Reproduction, Fertility and Development*, 17(6), 659. doi:10.1071/rd05024
108. Rodríguez, A.G., Bazán, A.G., Rodríguez, J.G., Espinoza, J.B., Vásquez, M.C., Lucas, J.L., y Huanca, W.L. (2013). Evaluación del folículo ovárico de yeguas criollas post-administración de hCG. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 24(2), 189-193.
109. Salles, M.G.F., y Araújo, A.A. (2010). Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, n.3, p.185-194.
110. Samper, J. C., Pycock, J.F., y Mckinnon, A.O. (2007). *Current Therapy in Equine Reproduction*. St. Louis: Saunders/Elsevier. 492 p.
111. Samper, J. C. (2008). Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and others do not. *Theriogenology*, 70(3), 445–447. doi:10.1016/j.theriogenology.2008
112. Samper, J. C. (2009). *Equine breeding management and artificial insemination*. (2a ed.). W B Saunders.
113. Santos, D. A. A., de Oliveira, M. B., y Ferreira, H. N. (2019). GnRH agonista (Acetato de histrelina) na múltipla ovulação em égua. *PUBVET*, 13, 152.

114. Schnobrich, M.R. (2018). Chapter:19 Disorders of the Reproductive tract. En Reed, S.M., Bayly, W.M., y Sellon, D.C., *Equine Internal Medicine*. (4ta ed.,pp.1217-1364). United States of American: Saunders Elsevier.
115. Segabinazzi, L. G. T. M., Oba, E., y Alvarenga, M. A. (2021). The Combination of hCG and GnRH Analog to Hasten Ovulation in Mares Does not Change Luteal Function and Pregnancy Outcome in Embryo Recipient Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 105, 103691. doi:10.1016/j.jevs.2021.103691
116. Serres, C., Gomez-Cuetara, C., Gutierrez-Cepeda, L., y Redondo, M. (2010). Effect of hCG administration at different times of the day on the interval to ovulation in mares. *Animal Reproduction Science* 121S, 74–75.
117. Silva, P. C. de A., Oliveira, J. P., Paiva, S. O., Caram, D. F., Junqueira, R. G. de C., Jacob, J. C. F., y Sá, M. A. F. (2016). Comparison between two ovulation-inducing drugs in mares. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 38(Supl.2), 45–48. Retrieved from <https://rbmv.org/BJVM/article/view/162>
118. Squires, E., McCue, P., y Vanderwall, D. (1999). The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, 51(1), 91–104. doi:10.1016/s0093-691x(98)00234-9
119. Squires, E., Carnevale, E., McCue, P., y Bruemmer, J. (2003). Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*, 59(1), 151–170. doi:10.1016/s0093-691x(02)01268-2
120. Squires, E. L. (2008). Hormonal Manipulation of the Mare: A Review. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28(11), 627–634. doi:10.1016/j.jevs.2008.10.010

121. Strelin® (2021). Botupharma. Disponible en: <https://botupharma.com/produto/strelin/>. Fecha de consulta: (29/9/2021)
122. Ungerfeld, R. (2011). *Reproducción en los animales domésticos - Tomo I*. Montevideo: Melibea. 293 p.
123. Van Niekerk, C. H., Morgenthal, J. C., y Gerneke, W. H. (1975). Relationship between the morphology of and progesterone production by the corpus luteum of the mare. *Journal of Reproduction and fertility*. Supplement, (23), 171-175.
124. Velázquez, N. (2014). La hormona gonadotrofina coriónica humana: Una molécula ubicua y versátil. Parte I. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, 74(2), 122-133.
125. Voge, J. L., Kendrick Sudderth, A., Brinsko, S. P., Burns, P. J., y Blanchard, T. L. (2012). Comparison of Efficacy of Two Dose Rates of Histrelin to Human Chorionic Gonadotropin for Inducing Ovulation in Broodmares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(4), 208–210. doi:10.1016/j.jevs.2011.09.065
126. Voss J L.(1993). Gonadotrophin in: Mackinnon A.O., y Voss J. L.. Eds. *Equine reproduction*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1993: 325 - 328
127. Wilson, C. G., Downie, C. R., Hughes, J. P., y Roser, J. F. (1990). Effects of repeated hCG injections on reproductive efficiency in mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 10(4), 301-308.
128. Woods, J., Bergfelt, D. R., y Ginther, O. J. (1990). Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic-loss rate in mares. *Equine Veterinary Journal*, 22(6), 410–415.

129. Youngquist, R.S., y Threlfall, W.R. (2007). *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. (2da ed.). United State of America:Elsevier Health Sciences. 1061p.