



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DEL FLUJO SANGUÍNEO DEL FOLÍCULO
PREOVULATORIO EN YEGUAS FINA SANGRE DE CARRERA**

Sofía Alicia Amor Núñez

Proyecto de Memoria para optar al
Título Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: DR. VÍCTOR HUGO PARRAGUEZ GAMBOA
PROFESOR CO-GUÍA: DR. IGNACIO ANDRES COLOMA CORREA
Departamento de Ciencias Biológicas Animales

SANTIAGO, CHILE
2013



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DEL FLUJO SANGUÍNEO DEL FOLÍCULO
PREOVULATORIO EN YEGUAS FINA SANGRE DE CARRERA**

Sofía Alicia Amor Núñez

Proyecto de Memoria para optar al
Título Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

	Nota Final
Profesor Guía	Víctor Parraguez G.
Profesor Corrector	Bessie Urquieta M.
Profesor Corrector	Mario Acuña B.

PROFESOR GUÍA: DR. VÍCTOR HUGO PARRAGUEZ GAMBOA
PROFESOR CO-GUÍA: DR. IGNACIO ANDRES COLOMA CORREA
Departamento de Ciencias Biológicas Animales

SANTIAGO, CHILE
2013

AGRADECIMIENTOS

He logrado hacer todo lo que he querido y cuanto se me ha pedido, con mucho esfuerzo y voluntad, pero por sobre todo con la ayuda de la gente que ha estado a mi lado y me ha apoyado. Mis padres, Rita y Fernando, mis amigos y una persona sin la cual definitivamente no lo habría logrado (simplemente porque nunca habría encontrado nada): Marcelina, y también a mi madrina, Pilar.

He hecho todo lo que he querido y definitivamente todo lo que se me ha ocurrido. Gracias por siempre apoyarme y ayudarme en todo lo que han podido, por las palabras de aliento y la fe constante en mí. Muchas veces pese a la falta de sueño y malas caras.

Gracias también a ciertos "personajes" que se cruzaron en mi vida e hicieron que ella tomara este camino, personajes de cuatro patas, a partir de los cuales se genera ésta historia: Peggaso, Harika y Montero; y a la única chica que se logro meter en este grupo, Yanara.

NDICE DE CAPITULOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
Características reproductivas de la yegua.....	5
Ecografía	5
Efecto Doppler	6
Aplicación clínica del ultrasonido.....	7
Irrigación del folículo.....	9
OBJETIVOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIÓN.....	26
BIBLIOGRAFÍA	27

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°1	11
FIGURA N°2	17
FIGURA N°3	18
FIGURA N°4	19
FIGURA N°5	20
FIGURA N°6	21
FIGURA N°7	22

RESUMEN

El valor económico de la monta de potros de calidad para la hípica es muy alto y, mientras de mayor valor sea el semental, habrá más interés en que éste cubra el máximo número posible de yeguas. Es por esto que se hace fundamental aumentar la eficiencia de los apareamientos. Predecir el momento de la ovulación incrementa la probabilidad de lograr la concepción con una monta.

La maduración folicular va acompañada de un incremento en el flujo sanguíneo (FS) ovárico perifolicular. Trabajos recientes demuestran que, si bien el folículo tiene un aumento diario de FS, pocas horas antes de la ovulación se detecta una brusca caída de la perfusión folicular. Estos fenómenos de cambio del FS en el ovario pueden ser observados mediante el eco Doppler y cuantificados por la velocimetría Doppler.

Este estudio tuvo como finalidad determinar con mayor precisión el momento de la ovulación mediante los cambios de FS que experimenta el folículo preovulatorio a través del Doppler color.

Los resultados muestran que el folículo, una vez que se vuelve dominante, aumenta su FS, lo que se ve reflejado en que la resistencia vascular que va disminuyendo desde el día -4 hasta el día -2. El día antes de la ovulación esta tendencia se invierte y en la mayoría de las yeguas se observó un alza en los índices de resistencia y pulsatilidad. Todas las yeguas que mostraron un alza brusca del índice de resistencia ovularon en menos de 24 h.

ABSTRACT

The economic value of fine thoroughbred stallions is very high. Furthermore, as the stud reaches higher values, there will be more interest for him to cover the largest number of mares. This explains why it is essential to increase the efficiency of mating. Predicting the moment of ovulation may allow successful conception after one mating.

Follicular maturation is associated to an increased ovarian perifollicular blood flow (BF). Recent studies show that while the follicle has a daily increase of BF, a sharp drop in the follicular BF is detected few hours before ovulation; these changes in the BF can be observed by echo Doppler and quantified using the Doppler velocimetry tool.

The aim of the present study was to determine more acutely the time of ovulation, following the preovulatory follicle BF changes by color echo Doppler.

The data show that the follicle, once it becomes dominant, increases its BF, being reflected in a decrease in vascular resistance from day -4 to day -2. One day before ovulation this trend is reversed, and in the majority of the mares, a rise of pulsatility and resistance indexes was observed. All the mares that showed an abrupt increase in the resistance index, ovulated in less than 24 h.

INTRODUCCIÓN

Actualmente el valor económico de la monta de potros de calidad para la hípica es muy alto. Además, mientras de mayor valor sea el semental habrá más interés en que éste cubra el mayor número de yeguas posibles por temporada. El potro, idealmente, no debe realizar más de dos cópulas diarias. Es por esto que se ha hecho fundamental aumentar la eficiencia de los apareamientos, logrando una adecuada concepción en el menor número de éstos, siendo lo ideal llegar a la preñez con una sola cópula.

Predecir con mayor precisión la fecha de la próxima ovulación permitiría evitar montas innecesarias o pérdidas de semen de alto costo en las razas en que se permite la inseminación artificial. Por lo tanto, optimizar el uso del semen de esta manera incide en forma sustancial en los costos de un programa de reproducción equina.

Los equinos fina sangre de carrera (FSC) cumplen año el primero de Julio en el Hemisferio Sur, por lo que es necesario cubrir a las yeguas idealmente en Agosto, dado su largo período de gestación. En este mes, las yeguas se encuentran en un período de transición de la función ovárica, por lo que presentan estros irregulares, prolongados y muchas veces anovulatorios. Lo anterior está asociado a cambios estacionales en el fotoperiodo. Estos factores hacen deseable definir con la máxima precisión posible el momento en que ocurrirá la ovulación, permitiendo realizar la monta o inseminación en el momento de máximo rendimiento concepcional, el que se encuentra entre 6 y 12 horas antes de la ovulación.

Diversos métodos se han utilizado para definir el momento de la ovulación en seres humanos, como cambios hormonales, curva de temperatura, etc. En los animales se ha intentado relacionar la ovulación con el inicio del celo, pero en las yeguas ésta se relaciona con el fin del celo, el que es de una duración variable, por lo tanto no tiene valor predictivo sobre el momento de la ovulación. Predecir la ovulación sirve para poder realizar la monta o inseminación con la mayor probabilidad de lograr la concepción. Actualmente el método más usado es la ecografía en tiempo real. Los médicos veterinarios prefieren cada vez más este método, ya que permite el diagnóstico y el estudio del estado reproductivo de una manera precisa, rápida, no invasiva y en tiempo real. Además, la ecografía al ser seriada,

permite ver y medir los distintos tamaños foliculares y su evolución (selección y dominancia), además de observar la expresión endocrina del celo en las características morfológicas del útero (edema uterino), entre otras características que ayudan a estimar el momento de la ovulación, así como la ovulación misma.

El efecto de Doppler, se basa en el principio físico descrito por Johan Christian Doppler en el siglo XIX, que establece que un sonido cambia de frecuencia al chocar con un cuerpo en movimiento. La diferencia entre la frecuencia emitida y la recibida es proporcional a la velocidad del cuerpo en movimiento.

La maduración folicular, que lleva hasta la ovulación, va acompañada de un incremento en el flujo sanguíneo ovárico perifolicular, el que puede ser estudiado mediante el uso del eco-Doppler. En este caso, al incidir el haz de ultrasonido sobre la arteria folicular se puede registrar la velocidad de la sangre en su interior, ésta está determinada por la resistencia de la microcirculación distante al punto en estudio, que en este caso es el que abastece el folículo en estudio.

El objetivo del presente estudio es caracterizar los cambios del flujo sanguíneo folicular que acompañan las últimas etapas de la maduración folicular, que permitan predecir de la mejor forma el momento de la ovulación en yeguas F.S.C., mediante la técnica del eco-Doppler.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Características reproductivas de la yegua

La yegua se caracteriza por ser poliéstrica de días largos. Su ciclo dura 21 a 22 días, siendo el diestro de 14 a 15 días y el estro de cuatro a siete días (Blanchard *et al.*, 2003). No obstante, la duración del celo o estro depende del momento de la temporada reproductiva, al inicio de ésta los estros tienden a ser más largos (Adams y Bosu, 1988).

La actividad reproductiva, luego del anestro, se retoma de forma paulatina, pasando por una fase de transición que dura cerca de 30 a 45 días antes de su primer ciclo verdadero (Ramírez, 2006); durante este período la concentración de FSH es óptima para producir el reclutamiento de folículos, pero al no liberarse LH en cantidad suficiente, no se desencadena la ovulación (Gigli *et al.*, 2006).

La mayoría de las yeguas ovulan en un plazo de 48 horas al final del estro. La probabilidad de preñez aumenta cuando las yeguas han sido cubiertas antes o en el momento de la ovulación (Ramírez, 2006).

Ecografía

La ecografía es una técnica diagnóstica basada en los ecos que genera el ultrasonido. Este consiste en ondas de sonido de alta frecuencia que no son audibles por el hombre. Los sonidos audibles están entre 20 - 20.000 hercios (Hz, o ciclos por segundo) y los ultrasonidos diagnósticos están entre 1 - 10 MHz (Giraldo, 2003). La ultrasonografía es una herramienta particularmente útil en veterinaria, por su facilidad de aplicación, obtención inmediata de imágenes que no requieren la inmovilidad prolongada del animal y que se realizan cada vez con equipos más portátiles, versátiles y de menor tamaño.

El primer trabajo de ultrasonido: “*Investigation of abdominal masses by pulses ultrasound*” fue publicado en Lancet en 1958 por el pionero de la ultrasonografía, el ginecólogo inglés Ian Donald. Desde entonces, la ultrasonografía se ha desarrollado como el método de diagnóstico por imágenes más utilizado. Este desarrollo ha sido especialmente amplio en

medicina veterinaria durante los últimos años, por la portabilidad de los equipos actuales y por la dificultad y costo encierran otros métodos de imagen más modernos como la tomografía axial computada (TAC) o resonancia nuclear magnética (RNM) (Guerra, 2011).

La imagen ultrasónica se forma gracias al principio de piezoelectricidad. El efecto piezoeléctrico fue descrito por Pierre y Jaques Curie en 1880. El cristal piezoeléctrico tiene como característica que al ser sometido a una diferencia de potencial eléctrico emite una vibración, la que se transmite como un sonido de alta frecuencia. De manera inversa, al recibir una onda mecánica, genera una pequeña diferencia de potencial. Por lo tanto, cuando sometemos al cristal a una diferencia de potencial (corriente eléctrica) el cristal se comprime (Guerra, 2011), produciendo una vibración que al propagarse, adquiere la propiedad de onda mecánica (Anón, 2001). Dicho de otra forma, el cristal emite un sonido de alta frecuencia y esa onda de sonido choca con los distintos elementos. Al chocar, una parte de esta onda rebota, volviendo a chocar con el cristal piezoeléctrico, el que a su vez genera una corriente eléctrica proporcional a la onda que lo deformó (Guerra, 2011). Esta señal eléctrica es procesada por un *software* y se muestra como un punto más o menos brillante en una pantalla (modo B, brillo). Cuando esto ocurre con varios cristales, se forma una imagen, la que al repetirse más de 16 veces por segundo, es percibida por el ojo humano como movimiento continuo (modo B; tiempo real) (Anón, 2001).

Efecto Doppler

El efecto Doppler fue descrito por primera vez por el austriaco Johann Christian Doppler en el siglo XIX; éste se basa en que todo sonido emitido desde un objeto en movimiento se altera cuando cambia la distancia entre el observador y la fuente de sonido. Este cambio causado por el movimiento se conoce como "modificación Doppler" y es consecuencia del fenómeno Doppler. De acuerdo con esto, cuando la frecuencia del sonido emitido por una fuente estática es fija, se puede calcular la modificación Doppler y se correlaciona con la velocidad del movimiento entre el blanco y el transductor (Tekay y Campbell, 2002).

Una onda mecánica que choca con un cuerpo en movimiento cambia su frecuencia (Guerra, 2011), por lo tanto, si en lugar de los tejidos el haz ultrasónico impacta contra los glóbulos

rojos que circulan en el interior de un vaso sanguíneo, el eco retorna al transductor con la frecuencia modificada (Lizana *et al.*, 2011). La variación de frecuencia es proporcional a la velocidad del cuerpo en movimiento con el que choca (Guerra, 2011).

En resumen, se entiende por Frecuencia Doppler a la diferencia entre la frecuencia de la onda emitida y la onda recibida (Anón, 2001).

El efecto Doppler relaciona los componentes sistólicos y diastólicos del ciclo cardiaco, obteniéndose así los índices relativos de impedancia, como índice de pulsatibilidad (IP) e índice de resistencia (IR), además de conocer la velocidad sistólica máxima y velocidad diastólica máxima (Tekay y Campbell, 2002). La velocidad de la sangre arterial varía según el ciclo cardiaco. Al comenzar el ciclo la velocidad tiene un ascenso rápido, hasta alcanzar el máximo sistólico (velocidad sistólica máxima), el factor más determinante de ésta es la contractibilidad cardiaca. A continuación la velocidad de la sangre disminuye durante el resto del ciclo cardiaco, hasta el punto mínimo (velocidad diastólica máxima), lo que está determinado fundamentalmente por la resistencia periférica al punto estudiado (territorio arteriolar). Además de los factores nombrados existen otros generales, como viscosidad de la sangre, elasticidad de los vasos, etc. (Guerra, 2011).

Aplicación clínica del ultrasonido

En la reproducción equina, la definición precisa del momento de la ovulación es un factor fundamental, en particular en centros de reproducción de diversas razas, como caballos de carrera, salto, árabes o criollos chilenos, ya que definir con mayor precisión la fecha de la ovulación permitiría evitar la pérdida de semen, con el consiguiente beneficio económico. Habitualmente, con la ecografía en modo B hay cuatro características primordiales para predecir la ovulación: diámetro folicular, prominencia de la banda anecoica, ecogenicidad y grosor de la granulosa (Silva *et al.*, 2006).

El abastecimiento de sangre hacia los folículos y el cuerpo lúteo está estrechamente relacionado con el crecimiento folicular, la atresia y la ovulación. En conjunto, los

complejos cambios estructurales, secretores y funcionales que se producen en el ovario están estrechamente relacionados con variaciones locales en el FS (Rodríguez *et al.*, 2012).

En diferentes estudios dirigidos a determinar el papel de la vascularización en las paredes de los folículos en crecimiento, se ha observado que antes de la desviación folicular, la tasa de FS es similar entre los distintos folículos, pero, luego de la selección del folículo dominante, éste tiene un mayor FS en comparación al resto de los folículos. Además, los folículos con FS detectable tienen diámetros mayores que el resto. Del mismo modo, se ha observado en folículos preovulatorios una extensa vascularización en las paredes foliculares. Todos estos hallazgos sugieren que el crecimiento folicular, la selección y la atresia están estrechamente asociados a los cambios en el FS. El cambio más importante en el ovario lo constituye la ovulación. Por ello, ha sido necesario caracterizar los cambios en el FS de los folículos (Rodríguez *et al.*, 2012).

Un estudio realizado en bovinos detectó que alrededor del inicio del *peak* de LH el FS se incrementa rápidamente y alcanza un máximo antes de la ovulación. Este estudio demuestra que habría una relación entre el FS local de la pared folicular con los cambios estructurales y funcionales que ocurren en ella durante el proceso de ovulación (Rodríguez *et al.*, 2012).

Un estudio realizado en 2006, con 21 yeguas, demostró que la disminución del índice de resistencia y de pulsabilidad fue mayor entre la hora 0 y 30 post inyección con hCG, reflejando un aumento del flujo sanguíneo en el grupo de yeguas que posteriormente resultaron preñadas. Estos índices vasculares se mantuvieron sin variación en las no preñadas, además, en este mismo período se produjo un aumento de la ecogenicidad de la granulosa y del grosor de la banda anecoica. Todo lo anterior apoya la hipótesis de dicho trabajo, que es asociar una mayor probabilidad de preñez con una mayor irrigación del folículo preovulatorio (Silva *et al.*, 2006).

En el trabajo citado se observó que un mayor flujo del folículo preovulatorio se asocia con mayor probabilidad de preñez. Esto fue respaldado por dos observaciones: mayor porcentaje de la pared con señal vascular y mayor disminución en el índice de resistencia (IR) e índice de pulsabilidad (IP) en las hembras preñadas comparadas con las no preñadas (Silva *et al.*, 2006).

La tecnología Doppler ofrece muchas posibilidades de medición, pero la arteria ovárica de las yeguas no permite acomodar el transductor para poder medir el ángulo de incidencia y obtener así la velocidad de flujo (Silva *et al.*, 2006). Por ello, cuantificar el flujo de manera absoluta (volumen/unidad de tiempo) es difícil en estos casos debido a la dependencia del ángulo de incidencia en la ecuación de Doppler. En consecuencia, los parámetros calculados son útiles no porque muestren una cuantificación absoluta del flujo, si no porque éstos son derivados de la curva de velocidad (variación de Doppler). El cálculo de estos parámetros se basa en el mismo espectro Doppler, o sea, se mantiene el mismo ángulo durante todo el ciclo cardíaco, los errores introducidos por el ángulo (así como otros efectos dependientes del instrumento) son normalizados y por tanto son independientes del ángulo de incidencia (Boote, 2003).

Los principales parámetros Doppler son el IP e IR. Para su cálculo las velocidades máximas y mínimas son relacionadas con la máxima y mínima variación de frecuencia a lo largo del ciclo cardíaco, aunque la velocidad máxima suele ser definida como velocidad sistólica máxima y la velocidad mínima como velocidad diastólica máxima. La velocidad media es estimada mediante una ecuación que toma la frecuencia media, determinándola a través de todo el ciclo cardíaco, lo que se hace en forma automática (Boote, 2003). Es por ello que estos índices de resistencia vascular son especialmente útiles pues son independientes del ángulo de incidencia (siempre que esté entre 0 y 60°), lo que lleva a que en la práctica estos índices si sean cuantificables (Silva *et al.*, 2006).

El IP sirve en caso de existir flujo reverso. Actualmente las variaciones menores entre los índices se obvian, ya que los ecógrafos traen un *software* que realiza los cálculos automáticamente (Boote, 2003).

Irrigación del folículo

El ovario es uno de los pocos órganos en el adulto sano donde el crecimiento, maduración y la degeneración de los vasos sanguíneos se produce en condiciones normales, particularmente dentro del ciclo reproductivo de la hembra (Hazzard y Stouffer, 2000). La neovascularización que ocurre en el folículo del ovario durante el ciclo menstrual se

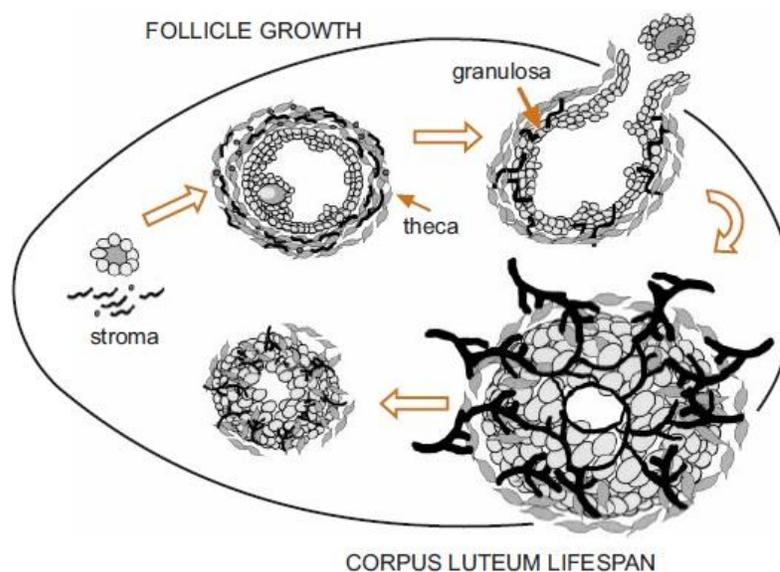
denomina "angiogénesis fisiológica" (Costello *et al.*, 2006). En situaciones anormales la angiogénesis es el factor central del crecimiento de los tumores malignos (Amor *et al.*, 2011).

La angiogénesis es el proceso por el que se desarrollan nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos maduros preexistentes, lo que lleva a la neovascularización. Los tejidos del tracto reproductivo femenino sufren una angiogénesis fisiológica cíclica en los procesos de la foliculogénesis ovárica, la formación del cuerpo lúteo y el desarrollo del endometrio. Esta angiogénesis fisiológica en el tracto reproductivo está regulada por factores proangiogénicos y antiangiogénicos (Costello *et al.*, 2005).

La vascularización ovárica no se distribuye por igual entre la gran cantidad de folículos en crecimiento y estacionarios. Los folículos primordiales y pre-antrales no tienen ningún aporte vascular propio, son irrigados indirectamente a través de los vasos del estroma circundante (Hazzard y Stouffer, 2000). Esto debido a que el ovocito no tiene suministro vascular directo, ya que no cuenta con vasos sanguíneos propios, por lo tanto el ovocito depende del oxígeno que difunde desde la microvasculatura de la capa tecal, que está alrededor del folículo, atravesando la membrana basal del folículo, células de la granulosa, líquido folicular y rodea zona pelúcida (Costello *et al.*, 2006).

En el ovario, los folículos primordiales y preantrales reciben su suministro de sangre de los vasos sanguíneos del estroma. Sin embargo, el posterior crecimiento de los folículos primarios lleva al desarrollo de una red vascular con aumento del flujo sanguíneo folicular. Cuando el folículo antral crece, adquiere una vaina vascular en la capa de teca que consta de dos redes concéntricas de los vasos en la teca externa e interna, cuando está completamente establecido (Costello *et al.*, 2005), como se muestra en la figura número 1.

Figura N° 1: Vascularización del folículo ovárico



Tomado de Hazzard y Stouffer, 2000.

Las arteriolas y vénulas de la red externa dentro de la teca externa mandan pequeñas ramas hacia la red interna del plexo capilar de una capa que está dentro de la teca interna, inmediatamente fuera de la membrana basal folicular. Esta red interior de los capilares no penetra en la membrana basal, ni entra en la capa de células de la granulosa del folículo no roto. Los capilares drenan el interior del plexo capilar, que los recogen en unos pocos vasos pequeños que se convierten en continuo con las venas medulares (Costello *et al.*, 2005).

El mayor aporte sanguíneo al folículo maduro está dirigido a la red interna que está ubicada en el borde interno de la teca interna, esto permite la entrega de nutrientes directamente a las células esteriodogénicamente activas de la teca interna y por difusión a la capa avascular de la granulosa y al oocito (Brännström *et al.*, 1998).

La calidad y la madurez de un oocito está influenciada por el contenido intrafolicular de oxígeno, que a su vez es proporcional al grado de vascularización folicular (Monteleone *et al.*, 2008). Se cree que el crecimiento folicular, así como atresia, se asocia con (y tal vez dependan de forma crítica) del grado de desarrollo vascular y soporte que éste le brinda (Hazzard y Stouffer, 2000).

El aumento del FS con un rápido aumento de LH en la etapa terminal de la maduración folicular se asocia con meiosis y con maduración del ovocito (Gastal y Gastal, 2011). Hay trabajos en humanos que demuestran que los embriones de folículos con mayor irrigación son mejores y tienen mejores resultados en la transferencia embrionaria (Bourne *et al.*, 1991).

Predecir el momento de la ovulación con un margen pequeño de variabilidad es importante y tiene implicancias prácticas para la industria equina. La inseminación cerca del momento de la ovulación (6-12 hrs) es importante para evitar el re-cruzamiento de las hembras, maximizando así los índices de concepción. Adicionalmente, se busca predecir el momento de la ovulación para recuperar ovocitos en programas de ovulación asistida (Gastal y Gastal, 2011).

Trabajos recientes demuestran que si bien el folículo tiene un aumento diario de FS, pocas horas antes de la ovulación se detecta una brusca caída de la perfusión vascular (Gastal y Gastal, 2011).

Este estudio tiene como finalidad determinar con mayor precisión el momento de la ovulación mediante los cambios de FS que experimenta el folículo preovulatorio a través del Doppler color.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los cambios de flujo sanguíneo (FS) del folículo dominante en yeguas FSC y su asociación con la ocurrencia de la ovulación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Describir los cambios de FS del folículo preovulatorio hasta la ovulación en yeguas FSC.
- 2.** Establecer la asociación entre la variación de los parámetros de la ecografía Doppler color y el momento de la ovulación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el Haras "San Patricio", ubicado en la comuna de El Monte, Región Metropolitana, durante la temporada reproductiva 2012, específicamente entre Agosto y Noviembre. Se utilizaron 14 yeguas FSC, cuyas edades oscilaron entre los cuatro y 14 años de edad.

El examen reproductivo se llevó a cabo una vez que la yegua estaba debidamente sujeta y preparada para la realización de éste, es decir, con la yegua dentro del brete y con la cola amarrada para que ésta no interrumpiera en la realización del examen. Sólo así se procedió con el vaciamiento del recto para comenzar con la primera parte del examen reproductivo, la palpación rectal. Para este procedimiento se utilizó como lubricante gel de ultrasonido. Todas las yeguas fueron sometidas a palpación rectal, obteniéndose así información de: presencia de ambos ovarios y su tamaño, tono uterino y estado del cérvix.

Luego se realizaron estudios ecográficos en cada una de las yeguas, para caracterizar los cambios cíclicos del tracto reproductivo. Los exámenes ecográficos se realizaron durante el estro. Para ello las yeguas fueron receladas diariamente, con el fin de determinar el momento en que entraron en estro y el momento en que éste terminó, y así realizar las eco-Doppler en el momento adecuado.

El examen ecográfico se realizó ocupando un equipo Medison (Sonovet RB®; Samsung, Seoul, Korea). Este equipo cuenta con Doppler color y con un transductor lineal de 6 MHz. Este equipo permite obtener imágenes en modo B, tiempo real, a fin de efectuar mediciones de las estructuras ováricas y obtener también la curva espectral de Doppler color, donde el *software* incorporado permite realizar mediciones manuales o automáticas de índices relativos de impedancia, velocidades máximas y promedio, entre otras.

Primero se realizó un examen ecográfico con modo B, en el cual se observó la presencia e intensidad de edema uterino, se registró la cantidad y tamaño de los folículos presentes en cada ovario, características del folículo dominante, si se produjo la ovulación y si ésta fue única o múltiple.

Luego del examen ecográfico en modo B, se utilizó el Doppler color, con el fin de medir los distintos índices que entregan los vasos sanguíneos que irrigan indirectamente a los folículos que fueron seleccionados y luego el que resultó dominante y ovuló. La ventana ecográfica para realizar estas mediciones se ubicó en la zona ovárica perifolicular donde el color fue más prominente, es decir, el punto donde se encontró la mayor intensidad de color, lo que refleja mayor velocidad. Esta ventana tuvo un espesor de 1 a 3 mm.

Para realizar las mediciones de la curva espectral Doppler se utilizó el registro de tres ciclos cardiacos, evaluándose así la variación de la velocidad del FS del folículo en observación, la que se vio reflejada en la curva Doppler. De los ciclos cardiacos registrados se seleccionó el mejor para realizar las mediciones de los parámetros Doppler.

Los índices medidos fueron:

- Índice de resistencia (IR): Refleja la resistencia al flujo arterial originado por el lecho microvascular distal al sitio de la medición. Se emplea en arterias que no tienen flujo reverso. El valor máximo que puede alcanzarse es igual a uno (Greatty, 2011). La ventaja del IR es su simplicidad de cálculo, ya que sólo se miden dos parámetros, por lo que tiene menor variación intra e interobservador (Boote, 2003).

$$IR = \frac{\text{Velocidad sistólica máxima} - \text{Velocidad diastólica mínima}}{\text{Velocidad sistólica máxima}}$$

- Índice de pulsatibilidad (IP): Evalúa la relación entre el funcionamiento cardíaco y la resistencia periférica. Este índice se puede utilizar en vasos sanguíneos en los que se produce flujo reverso (Greatty, 2010).

$$IP = \frac{\text{Velocidad sistólica máxima} - \text{Velocidad diastólica mínima}}{\text{Velocidad media durante todo el ciclo cardíaco}}$$

- Velocidad sistólica máxima: Peak sistólico.
- Velocidad diastólica máxima: Peak diastólico.

A cada yegua se le realizaron por lo menos dos exámenes con Doppler color en los últimos días del estro, antes de la ovulación (lo que fue determinado a través de los exámenes

ecográficos en modo B). Esto con el fin de definir en qué medida el Doppler, mediante los índices relativos de impedancia y eventualmente velocidades, es un buen predictor del momento de la ovulación en las yeguas.

Posterior a la ovulación se realizó un último examen ecográfico, con el fin de definir si los cambios observados estaban realmente correlacionados con la ovulación. En este examen se observó la ausencia del folículo dominante y la presencia y características del cuerpo hemorrágico (forma, coágulo de sangre) o lúteo.

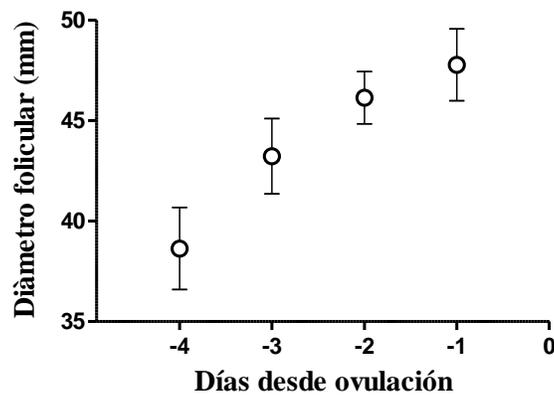
Los resultados obtenidos fueron analizados mediante estadística descriptiva. Con la finalidad de determinar si existen parámetros Doppler capaces de predecir con mayor precisión la ovulación. Se hicieron comparaciones del IR e IP entre los diferentes días antes de la ovulación, mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Se consideran diferencias significativas cuando $P \leq 0,05$. Los resultados se presentan como el promedio \pm la desviación estándar.

RESULTADOS

La figura número 2 muestra el crecimiento del diámetro folicular los días previos a la ovulación, siempre con una clara tendencia a aumentar de tamaño, hasta que se produce la ruptura folicular. El diámetro folicular aumentó desde $38,7 \pm 6,8$ mm en el día -4 hasta $47,0 \pm 6,8$ mm el día previo a la ovulación.

Figura N° 2

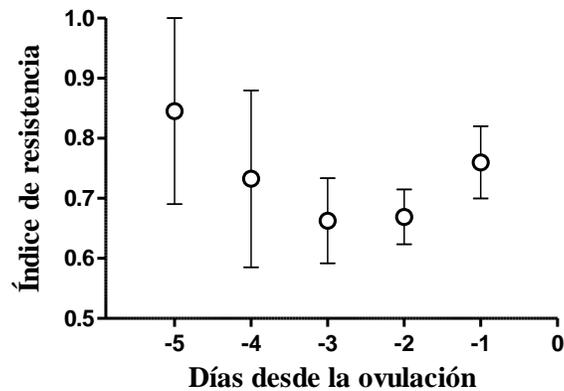
Variación del diámetro folicular los días previos a la ovulación en yeguas FSC



La figura número 3 muestra la variación del IR los días previos a la ovulación. El índice de resistencia disminuye desde el día -5 al -3 , sin sufrir mayores cambios entre el día -3 al -2 . La tendencia a disminuir que este índice presentó durante los primeros días del estudio se invierte sufriendo un brusco aumento, hasta el día previo a la ovulación. Algunas yeguas incluso llegaron a presentar flujo ausente con un índice de resistencia igual a 1.

Figura N° 3

Variación del índice de resistencia en los días previos a la ovulación en yeguas FSC

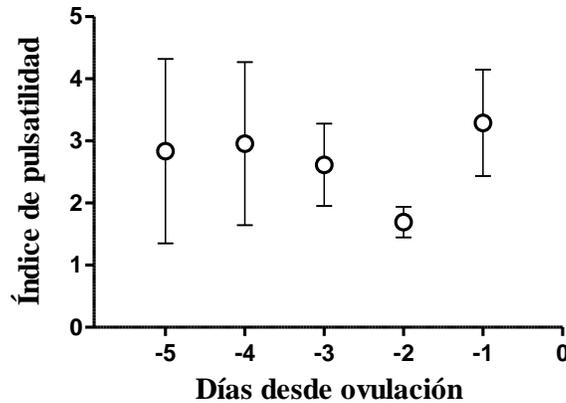


Al someter los datos al test no paramétrico Kruskal-Wallis no se encontraron diferencias significativas entre los promedios de cada día para la variable. Sin embargo, dado que al observar los datos se ven dos tendencias diferentes en la medida que se acerca la ovulación, se calcularon regresiones para los días -5 a -3 y -2 a -1. Las pendientes obtenidas confirmaron la observación, siendo negativa para el lapso día -5 a -3 (-8,931), haciéndose positiva en el lapso día -2 a -1 (11,01).

La figura número 4 muestra la variación del IP los días previos a la ovulación. El índice de pulsatilidad presentó desde el día -5 al día -2 una disminución de su promedio, pero este índice, al igual que el índice de resistencia, presentó un aumento brusco el día previo a la ovulación.

Figura N° 4

Variación del índice de pulsatilidad los días previos a la ovulación en yeguas FSC



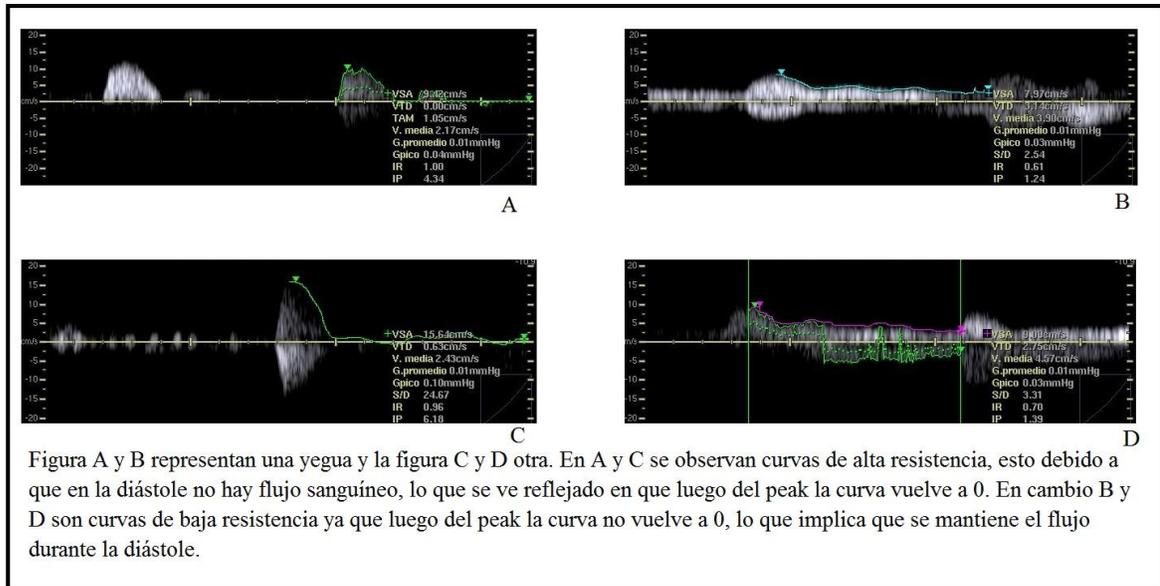
El 66,6% de las yeguas presentaron un aumento de la resistencia el día previo a la ovulación, llegando a mostrar flujo ausente o cercano a cero al final del diástole. Todas las yeguas que mostraron un aumento brusco de la resistencia ovularon en menos de 24 hrs.

En este estudio se pudo visualizar los cambios en las curvas de Doppler mediante la variación del IR. Cuando los folículos se hicieron dominantes presentaron curvas de baja resistencia. Inmediatamente antes de la ovulación, la mayoría de los folículos (66,6%) presentó un aumento marcado en sus índices de resistencia, llegando al máximo, es decir, flujo ausente al final del diástole.

En la figura 5, se muestran imágenes representativas del cambio de flujo sanguíneo durante el crecimiento folicular preovulatorio, obtenidas mediante la curva de Doppler color. Se observa cómo cambia la curva Doppler cuando un folículo se hace dominante y aumenta su FS, lo que se ve reflejado en una disminución del índice de resistencia que ocurre durante los días -5 a -3, curvas B y D. Se debe tener presente que el flujo aumenta o disminuye en proporción al cuadrado del radio del vaso sanguíneo, por lo tanto, el cambio en el flujo no es lineal sino cuadrático.

Figura N° 5

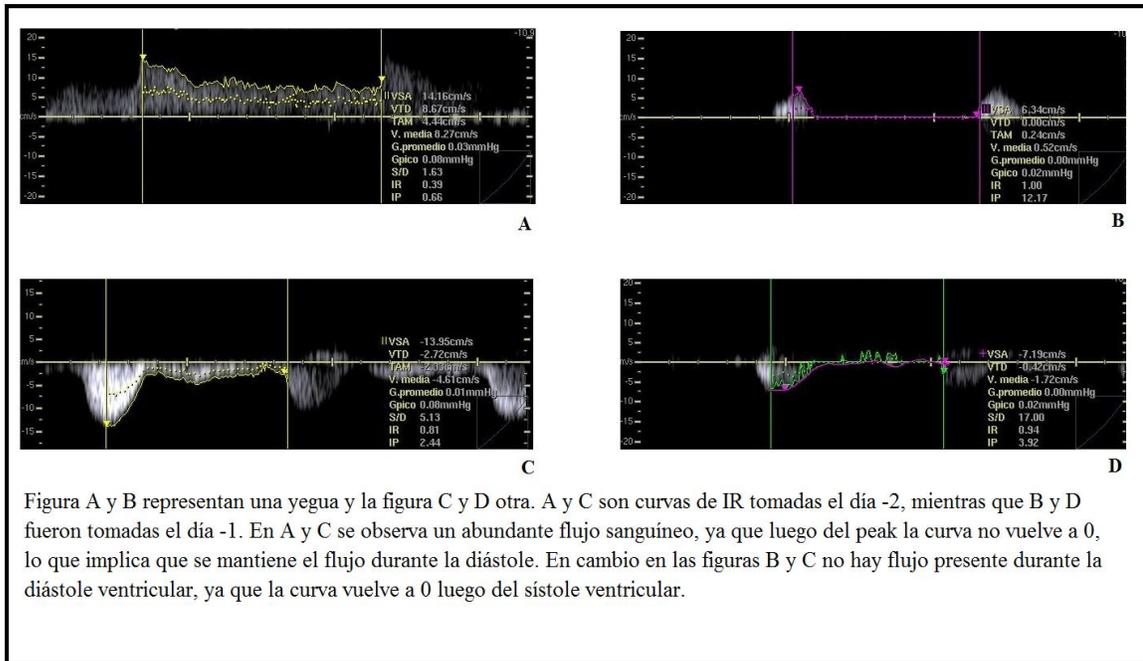
Disminución de la resistencia en folículos que logran la dominancia en yeguas FSC



La figura número 6 se muestran imágenes representativas de la disminución de flujo sanguíneo del folículo preovulatorio, demostrado mediante la curva de Doppler color. Se puede apreciar el aumento del índice de resistencia en el día preovulatorio. En ambos ejemplos se observa un aumento de la resistencia al flujo sanguíneo folicular desde el día -2 al -1 de la ovulación. Esto se ve reflejado en la permanencia de FS durante el sístole y la disminución del FS durante el diástole, debido al incremento de la resistencia. Esto se demuestra en que, durante el diástole, la curva de FS vuelve al eje X y se mantiene hasta que vuelve a ocurrir el próximo sístole ventricular. Las curvas B y D corresponden a alta resistencia vascular folicular, mientras que las curvas A y C son de baja resistencia, ya que el flujo se mantiene presente durante la diástole ventricular.

Figura N° 6

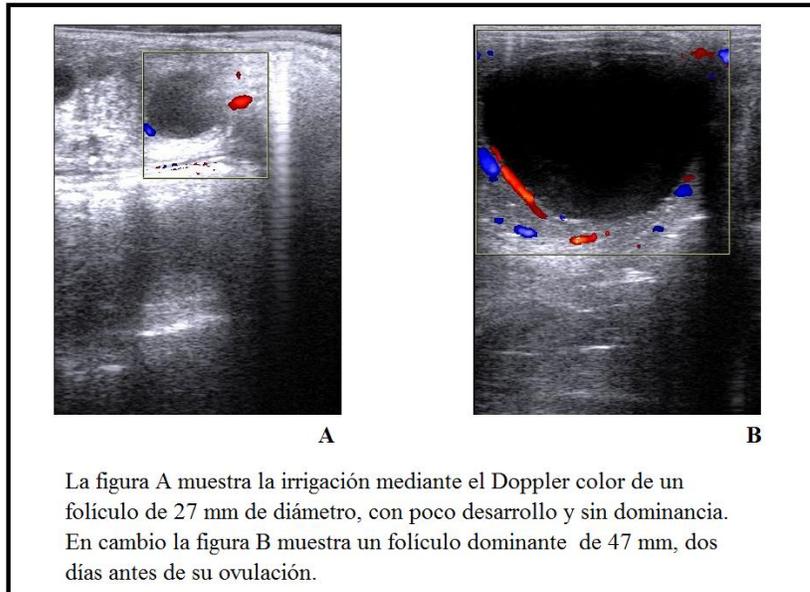
Aumento de resistencia vascular perifolicular el día previo a la ovulación en yeguas FSC



Por otro lado, se observó un aumento en la superficie ocupada por la señal de color perifolicular a medida que se acercó el momento de la ovulación, como se puede observar en la figura número 7. También se observó que las yeguas con ovulación inminente (aumento del IR en el día preovulatorio) disminuyeron la superficie perifolicular con señal de color.

Figura N° 7

Aumento de la irrigación peri folicular en yeguas FSC



DISCUSIÓN

El valor de los datos obtenidos permite observar el cambio de la pendiente en la recta que obtiene al graficar los datos.

La pendiente en los días -5 a -3 tiene un valor negativo, lo que nos indica que el IR va disminuyendo, con su consecuente aumento de flujo sanguíneo (FS), pero, a medida que se acerca el momento de la ovulación (día -1) esta pendiente se hace positiva, lo que nos indica una disminución de FS. Por lo tanto, los resultados muestran que una vez que el folículo se vuelve dominante aumenta su FS. Esto se ve reflejado en los cambios de la resistencia vascular (IR e IP), la que en promedio en los datos analizados va disminuyendo desde el día -4 hasta el día -2. Además, los datos muestran una tendencia al aumento de resistencia el día previo a la ovulación, aunque esto no se vio en todos los casos analizados (66,6%).

El aumento de flujo sanguíneo, con la consecuente disminución de los índices vasculares, se explica debido a que el crecimiento de los folículos primarios conlleva el desarrollo de una red vascular, la que aumenta el flujo sanguíneo folicular (Costello *et al.*, 2005). Este comportamiento concuerda con la teoría actual, la que dice que una disminución en las concentraciones de oxígeno local (hipoxia) es la causa principal de la angiogénesis en tejidos normales y patológicos, siendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) un factor inducible por hipoxia (Hazzard y Stouffer, 2000).

Hay diversos estudios que señalan cambios en el FS como predictor de preñez, como un estudio realizado en mujeres en 2009 por Wakeman y Benny, el que muestra que el flujo de sangre peri folicular aumenta antes de la ovulación y disminuye el índice de pulsabilidad (PI). Además, en dicho estudio se menciona que existe evidencia de que las tasas de implantación de fecundación in vitro son mejores con embriones de folículos con mayor vascularidad en el día de la recuperación de oocitos (Wakeman y Benny, 2009).

Otro estudio mostró que el IR fue significativamente menor en la fase luteal que en la fase folicular. Además, este estudio mostró en la curva Doppler un aumento de la dispersión del espectro de frecuencia con un perfil menos definido, ésto debido a la angiogenesis fisiológica, lo que se denomina conversión lútea. El patrón fundamental es un flujo

turbulento aumentado, que puede ser explicado por cambios en la red espiral intraovárica (irrigación indirecta); ésto consiste en la neoangiogenesis y de *shunt* arteriovenosos durante la fase lútea (Mercede *et al.*, 1992).

Un estudio que analizó 52 ciclos ovulatorios normales mostró que el *peak* sistólico de la fase lútea y velocidades máximas venosas fueron significativamente más altas, y los índices de resistencia y pulsatibilidad fueron significativamente menores que las que se encuentran en la fase folicular. El mismo estudio mostró que los folículos luteinizados sin ruptura no mostraron cambios significativos durante el ciclo ovárico, no mostraron señales a través de la eco-Doppler de conversión lútea. El flujo de sangre arterial y venoso intraovárico permanecen inalterados durante la luteinización de folículos sin ruptura, pero los niveles de progesterona sérica se correlacionaron con la velocidad máxima de la fase luteal máxima, lo que hace del Doppler un método potencialmente útil y no invasivo para evaluar la ovulación y la función lútea (Mercede *et al.*, 2001).

Respecto a las yeguas que mostraron una disminución en el FS preovulatorio, se puede mencionar que el área avascular puede tener un rol funcional durante el proceso ovulatorio (Brännström *et al.*, 1998). El aumento de los índices vasculares el día previo a la ovulación podría estar influenciado por el colapso de los vasos que irrigan al folículo debido al aumento de la presión intrafolicular, por lo tanto, disminuiría la irrigación en el punto en estudio, lo que podría repercutir en un debilitamiento de las capas que rodean al folículo, con su posterior necrosis y ovulación. El aumento de la presión intrafolicular en el folículo preovulatorio parece ser esencial para que la ruptura folicular proceda normalmente, como se ha establecido en ratas (Matousek *et al.*, 2001).

No se logró ver la disminución del FS preovulatorio en el 100% de los casos, lo que se podría explicar debido a que la disminución de éste ocurriría en menos de 24 hrs antes de la ovulación, y las ecografías en este estudio se realizaron cada 24 hrs, puesto que se ha reportado que puede haber un ciclo circadiano en el flujo ovárico de sangre (Brännström *et al.*, 1998), por lo que se tuvo cuidado en tomar los exámenes a la misma hora. Se debe tener presente que el 100% de las yeguas en las que se observó el alza del IR ovularon en menos de 24 hrs.

La teoría de que la disminución de FS ocurre en menos de 24 hrs antes de la ovulación es apoyada por un estudio que se realizó en seres humanos, en el que se observó una disminución del FS en el ápex folicular cuando se acercaba el momento de la ovulación, pero esta disminución de FS fue indetectable 20 horas antes de la ovulación (Hazzard y Stouffer, 2000).

La ausencia de flujo sanguíneo folicular se correlaciona con bajas tasas de recuperación de ovocitos, tasa de fertilización y calidad embrionaria. Es importante destacar que una mayor velocidad sistólica máxima (PSV) se asoció con buena calidad de embriones preimplantacionales (Hazzard y Stouffer, 2000).

Aunque en este estudio se obtuvieron valores de velocidades, éstos no fueron analizadas. Esto debido a que la corrección para el ángulo de insonación no se pudo realizar, debido a que no fue posible disponer de un vaso definido y de largo adecuado para el posicionamiento del cursor de ángulo (Ginther *et al.*, 2007), por lo tanto los valores de velocidad obtenidos no son representativos.

Se debe tener presente las limitaciones técnicas para obtener este tipo de datos. Entre las dificultades se pueden mencionar: mientras se registran los ciclos cardiacos, particularmente largos en la yegua debido a su baja frecuencia cardiaca, la yegua se debe mantener completamente quieta, lo que es muy difícil de conseguir. El peristaltismo intestinal, que está estimulado por el procedimiento, genera múltiples artefactos y dificultad para posicionar la ventana en la que se obtiene la señal para registrar la curva de Doppler.

CONCLUSIÓN

Aunque los resultados de este trabajo fueron obtenidos con un número reducido de yeguas, éstos concuerdan con los antecedentes encontrados en la literatura, respecto del aumento de la resistencia y eventual desaparición de la señal de color previo a la ovulación. Esto permite concluir que el uso de velocimetría Doppler, sumado a los signos de ovulación inminente obtenidos mediante la ecografía tradicional y el tacto rectal, mejoran la precisión en la predicción del momento de la ovulación en yeguas FSC. Sin embargo, se debe considerar la dificultad que implica registrar las curvas Doppler durante el examen ecográfico, teniendo presente que aunque el operador que realiza las mediciones se haya entrenado adecuadamente en esta técnica, el tiempo utilizado en el examen reproductivo de cada yegua se extiende sustancialmente.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, G.P.; BOSU, W.T.K.** 1988. Reproductive physiology of the non pregnant mare. *Vet Clin North Am Equine Pract* 4(2): 161-176.
- AMOR, F.; ALCÁZAR, J.; VACCARO, H.; LEÓN, M.; ITURRA, A.** 2011. GI-RADS reporting system for ultrasound evaluation of adnexal masses in clinical practice: a prospective multicenter study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 38(4): 450-455.
- ANÓN.** 2001. El sonido: bases físicas para su aplicación en ecografía. [en línea]. <<http://www.medsalud.com.ar/libro/archivo13.pdf>> [consulta : 11-06- 2012]
- BLANCHARD, T.; VARNER, D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.; BRINSKO, S.; RIGBY, S.** 2003. Reproductive physiology of the nonpregnant mare. **In:** Manual of equine reproduction. 2ª edición. Mosby. Massachusetts, Estados Unidos de América. pp. 9-15.
- BOOTE, E.** 2003. Doppler US techniques: concepts of blood flow detection and flow dynamics. *Radiographics* 23(5): 1316-1327.
- BOURNE, T.; JURKOVIC, D.; WATERSTONE, J.; CAMPBELL, S.; COLLINS, W.** 1991. Intrafollicular blood flow during human ovulation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1(1): 53-59.
- BRÄNNSTRÖM, M.; ZACKRISSON, U.; HAGSTROM, H.; JOSEFSSON, B.; HELLBERG, P.; GRANBERG, S.; COLLINS, W.; BOURNE, T.** 1998. Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. *Fertil Steril* 69(3): 435-442.
- COSTELLO, M.; SHRESTHA, S.; SJOBLUM, P.; McNALLY, G.; BENNETT, M.; STEUGRAD, S.; HUGHES, G.** 2005. Power Doppler ultrasound assessment of ovarian perifollicular blood flow in women with polycystic ovaries and normal ovaries during *in vitro* fertilization treatment. *Fertil Steril* 84(4): 945-954.
- COSTELLO, M.; SHRESTHA, S.; SJOBLUM, P.; McNALLY, G.; BENNETT, M.; STEIGRAD, S.; HUGHES, G.** 2006. Power doppler ultrasound assessment of the relationship between age and ovarian perifollicular blood flow in women undergoing *in vitro* fertilization treatment. *J Assist Reprod Genet* 23(9-10): 359-365.
- GASTAL, E.; GASTAL, M.** 2011. Equine preovulatory follicle: blood flow changes, prediction of ovulation and fertility. *Rev Bras Reprod Anim* 35(2): 239-252.
- GIGLI, I.; RUSSO, A.; AGÜERO, A.** 2006. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *InVet* 8(1): 183-204.
- GINTHER, O.; GASTAL, E.; GASTAL, M.; SIDDIQUI, M.; BEG, M.** 2007. Relationships of follicle versus oocyte maturity to ultrasound morphology, blood

- flow, and hormone concentrations of the preovulatory follicle in mares. *Biol Reprod* 77(2): 202-208.
- GIRALDO, C.** 2003. Principios básicos de ultrasonografía veterinaria. MVZ-Córdoba 8(2): 303-309.
- GREATTY, O.** 2010. Índice de pulsatibilidad [en línea]. <<http://www.arteriasyvenas.org/index/pulsatil>> [consulta : 09-07- 2012]
- GREATTY, O.** 2011. Índice de resistencia. [en línea]. <http://www.arteriasyvenas.org/index/indice_de_resistencia> [consulta: 09-07- 2012]
- GUERRA, F.** 2011. Principios básicos del ultrasonido. **In:** Curso avanzado de perfeccionamiento en ultrasonografía ginecológica. Santiago, Chile. 19 Noviembre 2011. Universidad Andrés Bello. pp. 18.
- HAZZARD, T.; STOUFFER, R.** 2000. Angiogenesis in ovarian follicular and luteal development. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14(6): 883-900.
- LIZANA, S.; AGUILERA, S.; QUIROZ, L.; ZÚÑIGA, L.; RODRÍGUEZ, J.** 2011. Seminario 96: Doppler en ginecología. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Campus Oriente. 32 p.
- MATOUSEK, M.; CARATI, C.; GANNON, B.; BRÄNNSTRÖM, M.** 2001. Novel method for intrafollicular pressure measurements in the rat ovary: increased intrafollicular pressure after hCG stimulation. *Reproduction* 121(2): 307-314.
- MERCE, L.; BAU, S.; BAJO, M.** 2001. Doppler study of arterial and venous intraovarian blood flow in stimulated cycles. *Ultrasound Obstet Gynecol* 18(5): 505-510.
- MERCE, L.; GARCES, D.; BARCO, M.; FUENTE, F.** 1992. Intraovarian Doppler velocimetry in ovulatory, dysovulatory and anovulatory cycles. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1;2(2): 197-202.
- MONTELEONE, P.; GIOVANNI, A.; SIMI, G.; CASAROSA, E.; CELA, V.; GENAZZANI, A.** 2008. Follicular fluid VEGF levels directly correlate with perifollicular blood flow in normoresponder patients undergoing IVF. *J Assist Reprod Genet* 25(5): 183-186.
- RAMÍREZ, J.** 2006. Determinación del fotoperíodo sobre la actividad ovárica en yeguas durante el año, en diferentes haras, en los departamentos de Guatemala, Sacatepequez y Escuintla. Tesis Médico Veterinario. San Carlos, Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 88 P.
- RODRÍGUEZ, L.; ABUELO, A.; BEJAR, J.; CAZAPAL, C.; LÓPEZ, L.; PÉREZ, A.; SANCHÍS, J.; VIGO, M.; TEIJEIRA, R.; CONTRERAS, J.; BECERRA, J.; BARRIO, M.; HERRADÓN, P.; QUINTELA, L.** 2012. El uso de la ecografía Doppler color en el control reproductivo del vacuno. Lugo, España. Universidad de

Santiago de Compostela, Facultad de Veterinaria de Lugo, Dpto. de Patología Animal. Reproducción y Obstetricia. 5 p.

SILVA, L.; GASTAL, E.; GASTAL, M.; BEG, M.; GINTHER, O. 2006. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. *Rev Bras Reprod Anim* 3(3): 339-346.

TEKAY, A.; CAMPBELL, S. 2002. Ecografía Doppler en obstetricia. **In:** Ecografía en obstetricia y ginecología. 4ª edición. Médica Panamericana S.A. Buenos Aires, Argentina. pp. 651-689.

WAKEMAN, S.; BENNY, P. 2009. Is it possible to predict a fertile cycle? Uteroovarian blood flow parameters in conception versus nonconception cycles. *Fertil Steril* 91(6): 2726-2731.