



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



**“EFECTO DE LA INDUCCIÓN DE OVULACIÓN CON
GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA, SOBRE
LA CONCENTRACION PLASMÁTICA DE
PROGESTERONA AL INICIO DE LA PREÑEZ
EN YEGUAS FINA SANGRE DE CARRERA”**

MARÍA CAROLINA DURÁN GRAEFF

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

**PROFESORES GUÍA: DRA. BESSIE URQUIETA MANGIOLA
DR. VÍCTOR HUGO PARRAGUEZ GAMBOA**

FINANCIAMIENTO: Fondo de Investigación Veterinaria (FIV) 4602005

SANTIAGO – CHILE
2007

ÍNDICE

TEMA	PÁGINA
▪ Resumen	4
▪ Summary	6
▪ Introducción.....	8
▪ Revisión Bibliográfica:	
- Características Reproductivas de la yegua.....	10
- Manejo Reproductivo en yeguas.....	18
- Características y efectos del uso de hCG.....	25
▪ Hipótesis.....	29
▪ Objetivos.....	29
▪ Material y Métodos.....	30
▪ Resultados.....	35
▪ Discusión.....	45
▪ Conclusión.....	53
▪ Bibliografía.....	54

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y quienes desde el cielo me cuidan, a mis padres y hermanos, por todas sus enseñanzas, ejemplo de esfuerzo y dedicación, y por estar siempre a mi lado apoyándome en los desafíos que me he propuesto.

A mis amigos por su apoyo incondicional en las distintas etapas de mi vida.

A mi profesor guía Dr. Víctor Hugo Parraguez Gamboa por aceptarme como su tesista, darme la posibilidad de realizar este estudio y enseñarme que las cosas siempre se pueden hacer mejor.

A mi profesora guía Dra. Bessie Urquieta Mangiola por todo el apoyo, asesoría y gran ternura entregada.

A mi profesor guía de terreno Dr. Ignacio Coloma Correa, por permitir la realización del estudio en el Haras San Patricio, por entregarme todas las facilidades durante la realización del mismo y por su incondicional entrega de conocimientos tanto teóricos como prácticos.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias y a todas las personas que participaron en mi formación tanto personal como profesional.

RESUMEN

La gonadotropina coriónica humana (hCG) es una de las hormonas más usadas para inducir ovulación en yeguas ciclantes. Su uso produce la ovulación 24 - 48 h post tratamiento, acortando el estro y disminuyendo el número de montas/ciclo, sin afectar aparentemente la tasa de preñez. Sin embargo, existen evidencias sobre posibles efectos adversos asociados a su uso, como la generación de anticuerpos anti-hCG, aumento de la mortalidad embrionaria y menores tasas de preñez.

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la inducción de la ovulación con hCG sobre el tamaño del cuerpo lúteo (CL) y la concentración plasmática de progesterona ([P₄]) al inicio de la preñez en yeguas FSC.

Un total de 33 yeguas FSC fueron distribuidas en 2 grupos: 21 yeguas (grupo hCG) a las que se aplicó 2500 UI de hCG e.v., al presentar un folículo preovulatorio entre 35 y 42 mm, edema uterino y aceptación del potro, indicándose monta 12 - 24 h post-tratamiento, y otro de 12 yeguas (grupo C), montadas al presentar un folículo preovulatorio > 45 mm con características ovulatorias, edema uterino y aceptación del potro. Se realizó un seguimiento ecográfico diario de las características foliculares y uterinas durante el estro. Ocurrida la ovulación, se midió el tamaño del CL los días 1, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 60, 75 y 90 postovulación (Po). A partir del día 12 Po también se evaluó el tamaño y las características del saco gestacional. En forma simultánea con la evaluación ecográfica, se obtuvo muestras de sangre para medir la [P₄] mediante radioinmunoanálisis (RIA).

El tamaño folicular preovulatorio del grupo hCG ($39,2 \pm 2,7$ mm) fue menor ($p < 0,0001$) al del grupo C ($51,0 \pm 1,8$ mm). En ambos grupos, la duración del celo fue similar (hCG: $4,7 \pm 1,7$ d; C: $5,6 \pm 1,3$ d). El número de montas por ciclo y por preñez fue menor en el grupo hCG ($p < 0,05$). El total de las yeguas del grupo hCG ovuló 24 - 48 h post-tratamiento. Entre las yeguas preñadas (hCG P y C P), sólo se detectaron diferencias en el tamaño del CL los días 1, 3, 40 y 45 Po, siendo el tamaño del CL menor en el grupo hCG P ($p < 0,05$). El tamaño del CL de las yeguas no preñadas fue similar (excepto el día 3 Po; hCG NP > C NP). La $[P_4]$ fue igual en todos los grupos hasta el día 8 Po, donde en los subgrupos hCG NP y C NP, la $[P_4]$ bajó a concentraciones basales. Entre los subgrupos hCG P y C P, desde el día 8 al 90 Po no se detectaron diferencias en la $[P_4]$. El tamaño del saco gestacional fue igual en los subgrupos hCG P y C P. Sólo el día 1 Po, se observó una relación positiva entre el tamaño del folículo preovulatorio y el del CL. Entre el tamaño del CL y la $[P_4]$ no se detectó asociación. La tasa de preñez/ciclo fue un 26,2% menor en el grupo hCG (hCG: 57,1%; C: 83,3%). La tasa de preñez/temporada fue similar en ambos grupos (hCG: 85,7%; C: 91,6%). No se observaron diferencias significativas para ambas características.

Se concluye que la inducción temprana de la ovulación con hCG produce CLs más pequeños sólo los primeros días Po, sin afectar la $[P_4]$. Una vez que las yeguas se preñan, sin importar el tamaño del CL, la $[P_4]$ es igual entre grupos, manteniendo las yeguas hCG P y C P de igual manera la gestación. A pesar de ello, un número importante de yeguas inducidas con hCG no quedaron preñadas, afectando negativamente la tasa de preñez/ciclo.

SUMMARY

Human chorionic gonadotropin (hCG) is commonly used to induce ovulation in cycling mares. Ovulation occurs 24 – 48 h after induction, reducing estrus duration and the number of services per cycle, apparently not affecting pregnancy rate. However, some negative effects have been reported, as anti-hCG antibodies development, higher embryonic loss and lower birth rates.

The objective of this study was to evaluate the effect of hCG-induced ovulation over corpus luteum (CL) size and plasma progesterone concentrations ([P₄]) during early pregnancy.

A total of 33 Thoroughbred mares were used, 21 (hCG mares) received i.v. a single injection of 2500 IU of hCG when follicle size was ≥ 35 and < 42 mm, with well developed uterine edema and estrus behavior, covered by the Stallion 12 - 24 h after treatment. Twelve mares (C mares) were covered when follicle size was > 45 mm with well developed uterine edema and estrus behavior.

Ultrasound examination was performed daily in all mares during estrus, measuring follicle size and evaluating uterine characteristics. After ovulation (Po), CL size was measured on day 1, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 60, 75 and 90. From day 12 Po, gestational sac measuring and evaluation was also performed. Blood samples were collected simultaneously to ultrasound evaluation, and afterwards analyzed for [P₄] by radioimmunoassay (RIA).

Preovulatory follicle size was smaller ($p < 0,0001$) in hCG mares ($39,2 \pm 2,7$ mm) than in C mares ($51,0 \pm 1,8$ mm). No significant difference was observed in estrus duration (hCG: $4,7 \pm 1,7$ d; C: $5,6 \pm 1,3$ d). In hCG mares the number of services per cycle and per pregnancy was lower than in C mares ($p < 0,05$). All hCG mares ovulated 24 – 48 h after treatment. CL size in pregnant mares (P hCG and P C), only on days 1, 3, 40 and 45 Po, was smaller ($p < 0,05$) in P hCG mares. CL size in non pregnant mares (NP hCG and NP C) was similar (except on day 3 Po, NP hCG > NP C). No differences in $[P_4]$ were observed among groups until day 8 Po. In NP hCG and NP C mares, $[P_4]$ declined to basal levels from day 8 Po. In P hCG and P C mares, $[P_4]$ was similar, showing the same pattern from day 8 until day 90 Po. No differences were observed in gestational sac size between P hCG and P C mares. A positive relationship between preovulatory follicle size and CL size was observed only on day 1 Po. No relationship between CL size and $[P_4]$ was detected. Pregnancy rate was similar between groups, however, the one cycle pregnancy rate in hCG mares was 26,2% lower than in C mares (hCG: 57,1%; C: 83,3%). The pregnancy rate for the season was 85,7% in hCG mares and 91,6% in C mares.

In conclusion, early induced ovulation with hCG generates smaller CL only during first days Po, not affecting $[P_4]$. Once mares were pregnant (P hCG and P C), they maintained pregnancy in the same way, with similar $[P_4]$, independent of CL size. In spite, an important number of hCG mares did not become pregnant, affecting negatively the pregnancy rate in the induced cycle.

INTRODUCCIÓN

Los equinos domésticos presentan varios aspectos particulares en cuanto a su fisiología reproductiva, selección y manejo productivo. A diferencia de lo que ocurre con otras especies pecuarias, la selección de estos animales se basa principalmente en sus aptitudes deportivas, en desmedro de sus habilidades reproductivas. A pesar del alto nivel de manejo de los haras y la intensa atención veterinaria a la cual estos animales están sujetos, diversos estudios han demostrado que los equinos presentan la menor eficiencia reproductiva dentro de las distintas especies mamíferas pecuarias, haciendo muy difícil alcanzar la meta de todo sistema de crianza, que es la obtención de una cría por yegua al año.

Una amplia variedad de manejos, han sido introducidos con el objetivo de incrementar la eficiencia reproductiva en yeguas. Para lograr esta mejora, sin duda es clave poder tener cierto control sobre el ciclo estral y el momento de la ovulación dentro de éste. La hCG se ha utilizado hace ya muchos años para inducir ovulación en yeguas, asegurando la ovulación en un tiempo determinado, acortando la duración del estro, permitiendo la monta en tiempos determinados, minimizando el número de montas por ciclo y facilitando el manejo reproductivo.

A pesar de las grandes ventajas que aporta el uso de este tratamiento hormonal, se ha postulado que al aplicar la hCG sobre folículos preovulatorios subdesarrollados, se formaría un CL de menor capacidad esteroideogénica, lo cual se vería reflejado en menores [P₄].

Siendo la progesterona, la hormona clave para la mantención de la gestación, se ha considerado la generación de CLs insuficientes como una posible causa de pérdidas tempranas de preñez. Sin embargo, existen limitadas evidencias que sustenten la existencia de insuficiencia luteal primaria como causante de pérdidas embrionarias tempranas en yeguas. Con el objetivo de avanzar en el conocimiento de este aspecto, el presente estudio tiene por finalidad determinar si la inducción hormonal de la ovulación de folículos dominantes de tamaño inferior al ovulatorio normal, efectivamente genera CLs de menor capacidad esteroideogénica, con [P₄] bajas al inicio de la gestación.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE LA YEGUA

La fisiología reproductiva en equinos domésticos, presenta particularidades propias que inciden en su manejo productivo. En primer lugar, la yegua se define como poliéstrica estacional de fotoperiodo largo. Durante su temporada reproductiva presenta ciclos de duración variable, dada principalmente por la extensión del período de celo (entre 3 a 9 d), ocurriendo la ovulación 24 a 48 h antes de su término (Hafez, 1987); no presentan un pico preovulatorio de hormona luteinizante (LH) como la mayoría de los mamíferos domésticos, sino que la LH aumenta gradualmente durante varios días del estro, alcanzando su máxima concentración plasmática un día después de la ovulación (Stabenfeldt *et al.*, 1975). Luego de la fecundación, la implantación del concepto es tardía, de modo que la mantención del ambiente progestacional depende exclusivamente del CL durante al menos los primeros 30 días de gestación, hasta la formación de CLs secundarios (este último hecho, también único en la especie). La duración de la gestación es de alrededor de 11 meses, lo que limita la temporada de monta.

Uno de los aspectos singulares respecto a su crianza, es la selección de animales basada en sus habilidades deportivas, mientras que en otras especies pecuarias, se le da preferencia fundamentalmente a la habilidad para reproducirse, además de otras cualidades productivas. A la selección en función del rendimiento atlético y pedigrí, en el caso de equinos Fina Sangre de Carrera (FSC), debe considerarse que en el hemisferio sur las crías cumplen años el 1 de julio, independientemente del mes de nacimiento, tratándose de

asegurar tanto partos como inicio de una nueva gestación lo más temprano dentro de la estación reproductiva, logrando con ésto el mayor desarrollo físico de la cría al momento de su debut como atleta (Hafez, 1987; Mc Donald, 1991).

El comportamiento reproductivo de la yegua, influido por el fotoperiodo, se puede dividir en 4 fases: anestro estacional, transición de primavera, temporada reproductiva y transición de otoño.

Anestro Estacional

Usualmente ocurre durante los días más cortos de invierno, caracterizado por incompetencia reproductiva en la mayoría de las yeguas. La concentración y secreción de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) a nivel de hipotálamo durante este periodo es baja, lo que determina que la concentración de hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) sea también baja o indetectable, lo cual resulta en pérdida de función ovárica, con desarrollo folicular y producción hormonal mínima. La receptividad sexual tiende a estar reducida o ausente (Frazer, 2004). Los ovarios son lisos y firmes, el útero atónico y de paredes delgadas. Debido a la ausencia de folículos y CL las concentraciones plasmáticas de estrógenos y progesterona también se mantienen bajas (Noden *et al.*, 1975).

Transición de Primavera

Comienza los primeros días de Julio y las yeguas presentan receptividad sexual irregular. Se caracteriza por un aumento de la secreción hipotalámica de GnRH, en respuesta

a un alargamiento de los días. Esto lleva a un aumento en la secreción de FSH, sin embargo, las concentraciones de LH permanecen bajas. En respuesta al aumento de FSH circulante hay mayor desarrollo folicular, aumentando los folículos en número y tamaño, superando los 35 mm el folículo de mayor diámetro. Estos folículos en su mayoría son anovulatorios, presentan una tasa de crecimiento de 1 a 2 mm por día (inferior al observado en folículos durante la temporada reproductiva), menor vascularización y menor número de células de la granulosa, con una producción esteroidogénica limitada (Frazer, 2004).

Transición de Otoño

Periodo que presenta la mayor variación. En respuesta a la disminución del fotoperiodo, al finalizar la temporada reproductiva, la conducta sexual y la ovulación se hacen más erráticas (LeBlanc, 1998). Se produce una pérdida gradual del soporte gonadotrófico para el funcionamiento ovárico, con el consecuente menor desarrollo folicular. Finaliza generalmente con la formación de un folículo preovulatorio que se hace anovulatorio o que involuciona (Frazer, 2004).

Temporada Reproductiva

En primavera, al aumentar las horas luz, principal factor que controla la actividad ovárica estacional, la secreción de melatonina desde la glándula pineal disminuye, permitiendo una mayor frecuencia y amplitud de liberación pulsátil de GnRH desde el hipotálamo, que estimula la secreción de FSH y LH. Las yeguas durante este periodo manifiestan sucesivos ciclos estrales, de alrededor de 21 días cada uno, si la gestación no

los interrumpe. Los ciclos consisten en 4 a 6 días de estro, seguidos por 16 - 17 días de diestro. Las variaciones en la duración total del ciclo y de cada una de sus fases se relacionan con la estación del año, con mayor variabilidad durante el inicio y 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).

Durante el *estro* la yegua acepta al potro, existe un desarrollo importante de folículos a nivel ovárico y aumentan las concentraciones plasmáticas de estrógenos que inducen los principales cambios estructurales y conductuales. A diferencia de lo que ocurre en otras especies, la yegua presenta altas concentraciones de LH durante un periodo preovulatorio prolongado (7 - 8 d), con un pico Po. Como durante el estro hay múltiples folículos en desarrollo, esta larga exposición a LH puede conducir a ovulaciones múltiples (LeBlanc, 1998).

Los estrógenos alcanzan concentraciones máximas (30 a 40 pg/mL) 2 a 3 días antes de la ovulación (Frazer, 2004). La mayor concentración de estrógenos preovulatorios produce un efecto de retroalimentación positiva sobre la hipófisis, favoreciendo el aumento de LH (LeBlanc, 1998).

La yegua durante el estro manifiesta distintos signos de celo, es excitable, relincha, busca otras yeguas o potros, asume una posición de orinar, orina en forma frecuente, demuestra interés considerable en el recelaje, levanta la cola y expone el clítoris (McDonald, 1991).

A nivel del tracto reproductivo se produce edema, el cérvix se relaja y cae. El edema es máximo 3 a 4 días antes de la ovulación y después de ocurrida ésta, comienza a desaparecer (Frazer, 2004).

Antes de la ovulación, los folículos suelen aumentar su tamaño con rapidez. Mediciones ecográficas de los diámetros foliculares, a través del ciclo estral de la yegua, reportan que luego del inicio de la etapa de dominancia folicular, lo que ocurre en promedio 7 días previo a la ovulación, el diámetro del folículo dominante aumenta 2,7 mm por día (Pierson y Ginther, 1985). El tamaño máximo alcanzado por el folículo preovulatorio en las yeguas, es considerablemente mayor que en otras especies (Stabenfeldt *et al.*, 1975). La ovulación espontánea en yeguas que pesan 400 - 550 Kg, suele ocurrir a partir de folículos de 45-65 mm de diámetro, mientras que en las más pequeñas (225 - 350 Kg), con folículos de 35 a 45 mm de diámetro (LeBlanc, 1998). Al acercarse el momento de la ovulación, puede haber un ablandamiento perceptible del folículo, cambio de forma esférica a piriforme y aumento del grosor de la pared folicular (Pierson y Ginther, 1985).

La ovulación, considerada como el día 0 del ciclo, ocurre con mayor frecuencia 24 - 48 h antes de finalizar el estro (Slusher *et al.*, s.f.). Con frecuencia, las yeguas exhiben signos de dolor leve en el sitio donde se presenta un folículo recién ovulado (LeBlanc, 1998).

Una vez ocurrida la ovulación, la yegua permanece en estro conductual durante más o menos 2 días, en los cuales comienza el desarrollo del CL. Se inicia así el *diestro*, periodo caracterizado por el rechazo del padrillo por parte de la yegua (McDonald, 1991). El CL,

formado a partir de las células foliculares remanentes, se considera maduro al día 5 Po, periodo durante el cual es refractario a la luteólisis inducida por prostaglandinas. Produce gran cantidad de progesterona, alcanzando concentraciones plasmáticas de 1,5 a 2,5 ng/mL (4,8 a 8 nmol/L) a las 24 h y 2,0 – 5,0 ng/mL (6,4 a 15,9 nmol/L) a las 48 h Po. Se han observado valores máximos de 8,0 a 20,0 ng/mL (25,4 a 63,6 nmol/L) en los días 5 a 8 del diestro, los que se mantienen altos hasta los días 14 - 15 del ciclo estral. La progesterona produce la contracción del cérvix y aumento de la viscosidad de las secreciones vaginales, estimula cambios proliferativos en el epitelio uterino y en las glándulas endometriales. A nivel central, induce la conducta de rechazo al padrillo (LeBlanc, 1998).

En ausencia de preñez, después del día 12 - 14 del ciclo, el útero secreta prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), que produce la regresión del CL y, con ello, la $[P_4]$ también cae a niveles basales, permitiendo que la yegua vuelva a entrar en celo (LeBlanc, 1998).

Una vez fertilizado el oocito, el cigoto inicia su viaje a través del oviducto, alcanzando el cuerno uterino el día 6 postfecundación. El día 8, el cigoto es movido hacia el cuerpo del útero. La fase de movilidad intrauterina del concepto continúa hasta los días 15 a 17. Para poder mantenerse la gestación, el embrión debe mandar señales antiluteolíticas a todo el endometrio. Al parecer, un factor embrionario causa la supresión de la secreción de $PGF_{2\alpha}$ e interrumpe la interacción $PGF_{2\alpha}$ -oxitocina durante la gestación temprana (Frazer, 2004).

El concepto generalmente se fija el día 16 de gestación a la base de uno de los cuernos uterinos, posiblemente debido al aumento del tono uterino, al engrosamiento de la pared uterina y a la rápida expansión del producto. En yeguas primerizas o secas, la fijación se produce con mayor frecuencia en el cuerno derecho, mientras que en las postparto se produce generalmente en el cuerno contralateral al de gestación anterior (LeBlanc, 1998).

La velocidad de crecimiento del concepto equino es de alrededor de 2 - 3 mm/día. Hasta el día 27 el saco vitelino provee el principal soporte nutricional, absorbiendo los nutrientes desde el útero. La placentación alantocoriónica precoz comienza los días 25 - 26. Hasta que la placentación no se haya completado (alrededor del día 100), el producto equino se nutre, parcial o totalmente, de las secreciones glandulares del endometrio, absorbiéndolas a través de la superficie coriónica que se enfrenta a las mismas (LeBlanc, 1998).

A partir del día 35 de gestación, un grupo de células especializadas del trofoblasto invade el endometrio, generando pequeñas agrupaciones de tejido con actividad endocrina, conocidas como las copas endometriales. Éstas se vuelven visibles a partir del día 38 - 40 como anillos pálidos que rodean el concepto en desarrollo. Debido a que las células fetales y maternas presentan genotipos distintos, los antígenos fetales estimulan una respuesta inmune materna, que termina removiendo las copas endometriales alrededor del día 120 de gestación.

Las copas endometriales son las responsables de secretar gonadotropina coriónica equina (eCG), antes conocida como gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG), que

posee actividad de FSH y LH. Alzas periódicas de FSH hipofisiaria estimulan una serie de ondas foliculares ováricas. La eCG proveniente de las copas endometriales estimula la luteinización (a veces también ovulación) de estos folículos, generando CLs secundarios o accesorios, que aumentan la concentración de progesterona que previamente sólo era producida por el CL primario originado al momento de la ovulación. Se detectan altos niveles de eCG desde el día 40 al 120 de gestación. Pérdidas embrionarias posteriores al día 35 – 40 de gestación no eliminan las copas endometriales, reduciendo la confiabilidad de la medición de eCG para el diagnóstico de preñez (Frazer, 2004).

Las células trofoblásticas del embrión, en conjunto con el endometrio, forman la superficie de contacto de la placenta. La placenta en yeguas presenta características únicas: no deciduada, epiteliocorial, difusa, y microcotiledonaria. Durante una gestación normal, el alantocorion no invasivo se extiende lentamente abarcando todo el útero entre los días 80 – 85 de gestación y recién desde los días 120 – 140 la arquitectura microcotiledonaria está completamente organizada (Frazer, 2004).

Durante la preñez, la progesterona se origina en los CLs primarios y secundarios hasta el día 70 - 90. Luego, la gestación se vuelve menos dependiente de la progesterona de origen ovárico. Sus concentraciones séricas se elevan en forma abrupta después de la ovulación inicial, con un pico el día 25 y luego disminuyen hasta el día 40 - 50, donde comienza a evidenciarse el desarrollo de un segundo pico que alcanza su máximo punto los días 80 - 90. Transcurrido este periodo, la concentración sérica de progesterona materna manifiesta una progresiva declinación hasta alcanzar el punto más bajo alrededor del día

150. Los días 120-150, todos los CLs involucionan, dejando a la placenta que secreta la cantidad de progesterona necesaria para mantener la preñez (LeBlanc, 1998).

La duración promedio de la gestación en la yegua FSC es de $342 \pm 8,5$ días (Díaz, 1991).

MANEJO REPRODUCTIVO EN YEGUAS

La meta de un sistema de crianza equino, es la obtención de una cría por yegua al año, lo que no es siempre fácil de lograr. Se ha demostrado que los equinos presentan la menor eficiencia reproductiva dentro de las distintas especies mamíferas pecuarias. A esto se agrega que la temporada reproductiva, impuesta para algunas razas, se limita a un período que coincide parcialmente con el anestro estacional (Malinowski, 1993).

El principal objetivo de un programa reproductivo equino es liberar el número adecuado de espermatozoides viables dentro del tracto genital de la yegua en el momento óptimo, logrando así, la máxima probabilidad de fertilización. Obstáculos para lograr este objetivo son: no poder coordinar la estación reproductiva fisiológica con el calendario reproductivo impuesto por la raza, no detectar correctamente el estro y así determinar el momento óptimo del apareamiento y dificultad para identificar y/o corregir anomalías reproductivas de la yegua (LeBlanc, 1998).

En general, las tasas de concepción son más altas cuando las yeguas son inseminadas 36 h antes y hasta el momento de la ovulación (Slusher *et al.*, s.f.).

Una variedad de manejos reproductivos han sido diseñados para maximizar la temporada reproductiva y lograr que las yeguas se preñen temprano en la temporada. Entre los más usados se encuentran: recelaje, inseminación artificial, luz artificial, palpación rectal, ultrasonografía y tratamientos hormonales (Malinowski, 1993).

El *recelaje* consiste en presentar a la yegua ante el potro para detectar su receptividad sexual. Los signos de conducta estral difieren en tipo e intensidad entre yeguas. Algunas, por ejemplo, pueden mostrarse más receptivas con un potro determinado. Mantener registros del recelaje y de la conducta estral es muy importante dentro de un programa de manejo reproductivo (Malinowski, 1993).

La *inseminación artificial* tiene múltiples beneficios como, uso de menores volúmenes de semen para inseminar, uso más eficiente del potro, disminuir el riesgo para la yegua y los trabajadores y reducir las infecciones uterinas. Está permitida en todas las razas, excepto en los FSC (Malinowski, 1993).

Programas de aplicación de *luz artificial* son usados para adelantar el inicio de la temporada reproductiva. Esto se logra con regímenes de 16 h luz y 8 h de oscuridad o un régimen interrumpido de 10 h luz, 8 h oscuridad, 2 h luz y 4 h oscuridad, dos meses antes de lo que se desea empezar la temporada reproductiva (Bergfelt, 2000).

La *palpación rectal* y la *ultrasonografía* son procedimientos comunes para mejorar la eficiencia reproductiva. Permiten la evaluación directa de las estructuras reproductivas, sus cambios cíclicos y estacionales, como también la detección de patologías del tracto

reproductivo. Además, ambos manejos son usados para predecir el momento de la ovulación, confirmar preñez y determinar anomalías reproductivas (Malinowski, 1993).

La *ultrasonografía* utiliza ondas sonoras de alta frecuencia (2–10 MHz), producidas por la estimulación eléctrica de cristales piezoeléctricos. A medida que las ondas sonoras pasan a través de interfases de tejidos de distinta densidad, una parte de ellas se reflejan (ecos), regresan al transductor y se convierten en impulsos eléctricos, creando una imagen en la pantalla del ecógrafo. El transductor es el elemento que produce el ultrasonido y recibe los ecos. En general, a mayor impedancia de las interfases, son mayores la cantidad de ondas sonoras reflejadas y la fuerza del eco producido. El líquido (folicular, del saco amniótico, etc.) es un excelente medio para la transmisión de las ondas sonoras y les provee poca impedancia, por tanto escasa reflexión de ecos, lo que genera en la pantalla una imagen color negro (anecoico). Los tejidos muy densos, como el hueso del piso de la pelvis, reflejan la mayor parte de las ondas sonoras y la imagen en la pantalla aparece blanca (ecoica). Otros tejidos se ven en una gama de grises, según su capacidad para reflejar las ondas sonoras, es decir, según su ecogenicidad. El sonido pasa a través de los tejidos en una banda estrecha y explora sólo una lámina delgada del mismo (LeBlanc, 1998). Los transductores de frecuencia media a media alta (5 y 7,5 MHz), son los más útiles para estudiar en detalle estructuras cercanas a los mismos (como se hace en el examen transrectal del tracto reproductivo de la yegua) (LeBlanc, 1998).

La manipulación de la yegua para la ultrasonografía transrectal es similar a la palpación rectal. Después de la palpación manual se introduce el transductor. Es necesario

asegurar un buen contacto entre el transductor y la pared rectal, para que no se interponga aire del recto ni de un asa intestinal llena de gas o líquido entre el transductor y el sitio por explorar (LeBlanc, 1998).

La ultrasonografía es útil para el control dinámico de los cambios uterinos y ováricos de la yegua durante el ciclo reproductivo, permitiendo un acceso rápido y no invasivo al tracto reproductivo, creando una imagen en tiempo real. Las posibles aplicaciones del examen ultrasonográfico de los ovarios incluye: estimación del estadio del ciclo estral, identificación de los folículos preovulatorios y de la ovulación, examen de los CLs y diagnóstico de alteraciones y/o lesiones ováricas. A nivel uterino la ultrasonografía permite: detección de preñez, determinación del tamaño uterino y de los pliegues endometriales y diagnóstico de lesiones uterinas (LeBlanc, 1998).

Usando un transductor de ultrasonido transrectal de 5-MHz, es posible detectar el 98% de los sacos gestacionales de 11 o más días de gestación, mucho antes de un diagnóstico por palpación (Frazer, 2004).

El concepto es, en dicha etapa, muy móvil dentro de la luz uterina. Se moviliza desde un cuerno al otro, pasando por el cuerpo y los días 9 - 10 se encuentra con mayor frecuencia en el cuerpo uterino. La movilidad comienza a disminuir alrededor del día 15, después del día 17 no se detecta más migración transuterina. El saco gestacional es esférico antes del día 17, mientras que más tarde es irregular. Tiene un techo o plataforma de crecimiento entre los días 17 y 24, luego retoma el crecimiento pero con más lentitud (LeBlanc, 1998).

Las imágenes por ultrasonido de los sacos gestacionales iniciales (10 - 14 d Po) tienen, a menudo, una línea ecogénica brillante en los polos dorsal y ventral con respecto al transductor. Esto no está asociado con el disco embrionario ni con otras estructuras, sino que se debe a una reflexión especular de los ecos (LeBlanc, 1998). El saco gestacional puede ser confundido fácilmente con quistes uterinos, ya que ellos también pueden ser esferas anecoicas con reflejos especulares, pero no son móviles y no aumentan de tamaño como el saco gestacional (Frazer, 2004).

El embrión dentro del saco gestacional es detectado por primera vez por medio del ultrasonido el día 20 - 25 y se observa en la cara ventral de éste. El latido cardíaco se detecta, a menudo, alrededor del día 22. El crecimiento del alantoides comienza el día 24, con la consecuente contracción del saco vitelino. Esto produce el movimiento del embrión desde ventral (día 24) hacia dorsal (día 40) de la vesícula. Después que el saco vitelino se ha degenerado el día 40, el aumento en tamaño y peso del feto causa el descenso gradual del feto hacia el piso de la vesícula corioalantoídea, el cordón umbilical se elonga desde el polo dorsal, observándose el feto en decúbito dorsal desde el día 50 en adelante (LeBlanc, 1998).

El gradual crecimiento del saco gestacional permite palpar distintos aumentos de tamaño a nivel uterino a medida que avanza la gestación. Así, se puede describir en forma empírica que el día 30 es del porte de un huevo de gallina, el 35 de un huevo de ganso, el 40 a 45 del porte de una naranja (LeBlanc, 1998). El feto se hace más oval al expandirse al tercer mes de gestación. Al día 90 el saco gestacional ya es del tamaño y forma de una

pelota de fútbol. Generalmente el feto recién es detectable mediante palpación después del día 120 (Frazer, 2004).

La muerte embrionaria precoz se diagnostica cuando un saco gestacional no se observa en dos exploraciones ecográficas consecutivas o cuando sólo se observa un remanente de un saco gestacional, al detectar forma irregular e indentada del saco, pliegues endometriales prominentes, líquido en la luz uterina, líquido vesicular con manchas ecoicas, ausencia de latido cardíaco del embrión, mala definición de la estructura fetal, sacos anormalmente pequeños y/o con crecimiento más lento (LeBlanc, 1998).

En general, la ultrasonografía (2 - 10 MHz), no causa una vibración mecánica, cavitación, ni aumento térmico de suficiente magnitud como para provocar un efecto biológico. En el inicio de la gestación, este procedimiento puede realizarse aparentemente a menudo sin perjudicar la preñez (LeBlanc, 1998).

Los *tratamientos hormonales* en yeguas incluyen el uso de prostaglandina, progesterona y progestágenos sintéticos, estrógenos, GnRH y hCG. La terapia hormonal puede ser usada para corregir alteraciones en el ciclo estral normal, facilitando el manejo en el periodo de transición, sincronización para programas de cruce con un potro específico o para transferencia embrionaria (Malinowski, 1993).

PGF₂α: es liberada naturalmente por el endometrio uterino causando luteólisis. Esta hormona y sus análogos, al administrarse exógenamente, son valiosas herramientas para inducir regresión del CL y retorno al estro (Bergfelt, 2000). Su uso es más efectivo 6 - 8

días después de la ovulación, reduciendo potencialmente el intervalo entre un estro y otro (Slusher *et al.*, s.f.).

Progesterona y progestágenos: son usados para acortar estros prolongados durante el periodo de transición, suprimir la conducta estral y suplementar la progesterona endógena para mantención de la preñez (Malinowski, 1993).

Estrógenos: su uso se limita a la inducción del estro en yeguas ovariectomizadas y en yeguas con celos silentes. También son administrados para favorecer mecanismos de defensa del útero (LeBlanc, 1998).

GnRH: método introducido con la finalidad de adelantar el inicio del crecimiento folicular durante el anestro y como tratamiento alternativo al uso de hCG para inducir la ovulación. La respuesta ovulatoria a su aplicación es variable (LeBlanc, 1998).

hCG: hormona de actividad similar a LH, usada para inducir la ovulación en yeguas. Es comúnmente incorporada en programas de manejo reproductivo, para acortar el estro y acelerar la ovulación, dentro de la aplicación para sincronización (Intervet, s.f.).

CARACTERÍSTICAS Y EFECTOS DEL USO DE hCG

La hCG se introdujo con el fin de aumentar la eficiencia reproductiva en yeguas. Es una hormona glicoproteica, producida por citotrofoblastos de placenta humana que posee principalmente actividad biológica de LH en yeguas (Bergfelt, 2000).

Hace más de 40 años que la hCG se ha usado para inducir la ovulación de folículos preovulatorios en yeguas ciclantes, con el fin de asegurar la ovulación 24 a 48 h después de su aplicación, acortando el estro en 1 - 3 días y permitiendo la monta en tiempos predeterminados, aumentando así, aparentemente, la tasa de preñez (McCue *et al.*, 2004). El uso de hCG en dosis de 1500 - 3000 UI puede estimular la ovulación 24 - 48 h después de su aplicación, con un 82-90% de éxito (Meyers, 1997; Kilicarslan *et al.*, 1996).

Para obtener los resultados deseados, es importante el momento del estro en el cual se aplica la hCG, ya que la sensibilidad de las células foliculares es distinta. Las células de la granulosa de folículos pequeños, unen menos hCG que las de folículos grandes (Meyers, 1997). Al aplicar hCG a yeguas que manifiestan conducta estral, con buena edematización endometrial y folículos de al menos 30 mm de diámetro, se puede esperar una respuesta satisfactoria a la inducción (Bollwein y Braun, 1999).

Un reporte sobre el uso de hCG para la inducción de ovulación en yeguas, demostró que efectivamente este tratamiento acorta en 1 a 3 días la duración del estro, mas, la tasa de concepción fue igual a las sin tratamiento (Voss *et al.*, 1975). Sin embargo, en un estudio retrospectivo de los registros de dos temporadas reproductivas sucesivas del haras "Santa

Isabel”, V Región, se detectaron mayores pérdidas embrionarias, menores porcentajes de parición y mayor número promedio de montas en yeguas en las cuales se usó hCG para la inducción de ovulación, respecto a las yeguas sin tratamiento (Zúñiga, 2005).

Lo anterior se podría explicar porque es frecuente que la hCG se aplique en yeguas en las que sus folículos no han alcanzado un tamaño preovulatorio normal, cuyas células no han terminado su proceso de multiplicación y maduración. Esto podría traducirse en que la capacidad esteroidogénica de los CLs provenientes de estas células, sea insuficiente, llevando a la incapacidad de las yeguas para mantener la gestación (Zúñiga, 2005).

La preparación de las células luteales sintetizadoras de progesterona se inicia antes de la ovulación, tanto así que en algunas especies, incluida la yegua, la luteinización puede incluso ocurrir sin producirse una ovulación previa. Se debe considerar que los distintos mecanismos que conllevan a la luteinización no sólo dependen de la ruptura folicular, por lo cual la ovulación no garantizará un desarrollo y función luteal normal (Smith *et al.*, 1994).

En un estudio en yeguas, basado en la medición de las concentraciones de esteroides en el fluido folicular, se demostró que folículos de menos de 34 mm de diámetro producen significativamente menos progesterona que los de mayor tamaño (Watson y Hinrichs, 1988). Otro estudio realizado en bovinos, en el cual se redujo el tamaño folicular mediante aspiración de fluido folicular (*in vivo*), se observó que los CLs provenientes de folículos aspirados eran de menor tamaño, en relación a los CLs controles. Además, la [P₄] fue significativamente menor en las vacas tratadas respecto a las controles (Vasconcelos *et*

al., 2001). En ovejas, otro estudio mostró que la inducción de la ovulación 28 h antes de la ovulación espontánea, produce CLs de menor tamaño, con menor número de células esteroidogénicas y menores [P₄] (Murdoch y Van Kirk, 1998).

Siendo la progesterona una hormona clave para la mantención de la gestación, se ha propuesto que diversas pérdidas de preñez se pueden relacionar con una producción reducida de progesterona a partir del CL, a través de distintos mecanismos: 1) insuficiencia luteal primaria; 2) luteólisis debido a inflamaciones uterinas con posterior liberación de prostaglandina F_{2α}; 3) insuficiente capacidad del trofoblasto para prevenir la luteólisis y 4) luteólisis posterior a endotoxemia sistémica. La luteólisis posterior a inflamaciones uterinas (endometritis), insuficiencia trofoblástica y endotoxemia han sido bien documentadas, no así la pérdida embrionaria temprana asociada a bajas [P₄] debido a la formación de CLs insuficientes (Daels, 2004).

Estudios ultrasonográficos han indicado que los porcentajes de pérdidas de preñez en yeguas sanas varían de 1,1% a 2,1% desde el día 11 al 40 de gestación. En yeguas “subfértils” los porcentajes son considerablemente mayores, registrándose hasta el día 11 de gestación un 32%, del día 11 al 15 un 7% y del día 15 al 40 un 8%. En ausencia de otros factores causantes de pérdidas embrionarias (como por ejemplo inflamaciones uterinas, endotoxemia, etc.), se ha informado como posible causa la insuficiencia luteal primaria, que hasta el momento se ha detectado en un número reducido de yeguas, llevando a la disminución de las [P₄] y posterior muerte embrionaria (Ginther, 1992).

Estudios sobre la competencia oocitaria para la maduración *in vitro*, demostraron que la adquisición de la competencia meiótica del oocito necesaria para la fertilización, ocurre progresivamente durante el crecimiento antral del folículo, determinando que la competencia oocitaria está fuertemente influenciada por el estado del ciclo estral y por el diámetro folicular. Es por ello, que oocitos provenientes de folículos preovulatorios al final del estro (de diámetro mayor a 35 mm), presentan una tasa de maduración considerablemente mayor a aquéllos provenientes de folículos de menor diámetro (Goudet *et al.*, 1998). Estos antecedentes sobre la maduración folicular a lo largo del estro, debieran considerarse al momento de intervenir el proceso con la inducción de la ovulación con hCG u otro tratamiento hormonal.

HIPÓTESIS

La inducción hormonal de la ovulación de folículos dominantes de tamaño inferior al ovulatorio normal, genera CLs de menor capacidad esteroideogénica, por lo que las [P₄] son bajas al inicio de la gestación.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la inducción de ovulación con hCG, sobre la actividad esteroideogénica luteal al inicio de la preñez en la yegua FSC.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Evaluar el efecto de la inducción de la ovulación con hCG en folículos de tamaño inferior al ovulatorio normal, sobre el tamaño del CL maduro.
- 2.- Medir las [P₄] al inicio de la gestación, en yeguas con y sin inducción hormonal de ovulación.
- 3.- Relacionar el tamaño del CL formado luego de la ovulación, inducida o espontánea, con las [P₄].
- 4.- Evaluar la calidad de la gestación temprana (tamaño y densidad ecográfica del saco gestacional y del concepto, latidos cardíacos, desarrollo de membranas embriofetales) en relación a las [P₄].

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el haras San Patricio, ubicado en la Comuna de El Monte, Región Metropolitana, desde Septiembre de 2006 a Febrero de 2007.

Se usó un total de 33 yeguas FSC de 5 a 15 años de edad y peso corporal entre 450 y 550 kg, paridas en la temporada, por lo tanto, de fertilidad probada.

Siguiendo el manejo habitual del haras, todas las yeguas fueron mantenidas a potrero durante el día y estabuladas en la noche en pesebreras individuales, alimentadas en base a pradera natural mejorada con ballica, pasto ovillo y trébol, además suplementadas con avena y aditivos vitamínicos minerales comerciales y agua *ad libitum*.

Luego del parto normal, se inició la detección de celo mediante un potro celador en forma diaria. El primer celo postparto, también conocido como “celo del potrillo”, no fue usado, debido a la baja fertilidad natural que éste presenta, asociado a la insuficiente involución del tejido uterino (Pycocock, 2000).

Iniciado el segundo período de celo, se evaluó periódicamente el tracto reproductivo, con especial énfasis en el crecimiento folicular ovárico y las características ecográficas propias del celo en el tejido uterino, mediante ecografías transrectales cada 24 h con un ecógrafo de tiempo real, con transductor lineal trasrectal de 5-MHz y respaldo fotográfico de las imágenes. Durante este periodo de celo, las yeguas fueron distribuidas al

azar en 2 grupos¹, un grupo de 21 yeguas a las cuales se indujo la ovulación con hCG (grupo hCG) y otro de 12 yeguas controles, no tratadas (grupo C).

A las yeguas integrantes del grupo hCG, se les inyectó una dosis única de 2500 UI de hCG (Chorulón®, Intervet) vía e. v., al detectar las siguientes características:

- aceptación del potro
- diámetro del folículo dominante mayor a 35 mm e inferior a 42 mm
- edema uterino

La monta se llevó a cabo 12 - 24 h después de haber aplicado el tratamiento hormonal.

En las yeguas del grupo C la monta se indicó inmediatamente después de detectar:

- aceptación del potro
- diámetro del folículo dominante de al menos 45 mm
- características foliculares de posible ovulación espontánea (cambio de forma del folículo, aumento del grosor de la pared folicular y ablandamiento del folículo a la palpación)
- edema uterino

Si a las 48 h postmonta aún no ocurría la ovulación, se procedía a repetir la monta.

¹ El número de animales por grupo se determinó en base a la variabilidad de la concentración plasmática de progesterona en hembras ciclantes y gestantes, con un $\alpha = 0,05$ y $\beta = 0,8$.

El estudio ultrasonográfico del tracto reproductivo continuó cada 24 h hasta el día 4 Po. Posteriormente, se realizaron ecografías los días 8, 12, 16, 20, 25, 30, 35, 40 y 45, luego cada 15 días hasta el día 90 Po.

La monta fue realizada por uno de los dos potros del haras, dependiendo del potrero designado a cada yegua en la planilla de monta del criadero (ambos potros con una fertilidad mayor al 90% en la temporada anterior).

El diagnóstico de preñez se realizó el día 12 Po y fue confirmado entre el día 14 y 16 Po. La descripción ultrasonográfica desde el día 12 incluyó la descripción y evaluación del saco gestacional y de las características embriofetales. Toda la información generada en cada evaluación fue registrada en fichas reproductivas individuales por yegua.

En forma simultánea con los exámenes ecográficos, se obtuvo muestras de sangre (5 mL) por punción yugular, con jeringas desechables heparinizadas. Inmediatamente después de obtenidas las muestras, éstas fueron centrifugadas a 1200 x g durante 5 minutos para la obtención de plasma, que se mantuvo congelado a -20°C hasta su análisis. La medición de la [P₄] se realizó mediante RIA de fase sólida (Coat-a-Count®, Diagnostic Products Co.™, EE.UU.), método previamente validado para su uso en yeguas (Reimers, 1991). El antisuero anti-P₄ es altamente específico para progesterona, con una reactividad cruzada particularmente baja con otros esteroides de producción natural o drogas terapéuticas que puedan estar presentes en las muestras de los animales. La variación intraanálisis para una muestra de 85,3 nmol/L de progesterona tuvo un CV % = 4,9 y para una muestra de concentraciones medias (21,5 nmol/L) la variación interanálisis fue de CV % = 8,5.

En las yeguas negativas al diagnóstico de preñez, el estudio ultrasonográfico y la obtención de muestras de sangre finalizó una vez que éstas volvieron a entrar en celo.

Características evaluadas

- Tamaño folicular: promedio entre el ancho y largo del folículo.
- Tamaño del CL: promedio entre el ancho y largo del cuerpo lúteo.
- Tamaño del saco gestacional: promedio entre el ancho y largo del saco gestacional.
- Duración del celo: desde que se detectó el inicio del celo con el potro celador, hasta alcanzar una $[P_4]$ de 3,18 nmol/L equivalente a 1 ng/mL, de acuerdo a la definición de estro de LeBlanc (1998).
- Tasa de preñez por ciclo: número de yeguas preñadas el en ciclo en estudio, sobre el número de yeguas servidas en el mismo ciclo, por 100.
- Número de montas por ciclo: promedio de las montas recibidas por yegua en el ciclo en estudio.

Adicionalmente también se evaluó las siguientes características:

- Tasa de preñez por temporada: número de yeguas preñadas en la temporada, sobre el número de yeguas servidas en la temporada, por 100.
- Número de montas por preñez: promedio de las montas necesarias por yegua para quedar preñada durante la temporada en estudio.

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos en ambos grupos (hCG y C), para tamaño folicular preovulatorio y tamaño del CL en los distintos días de muestreo, duración del celo y número de montas por ciclo y por preñez, fueron comparados por la prueba de t de Student.

Debido a que no todas las yeguas quedaron preñadas en el ciclo en estudio, con la finalidad de poder analizar y comparar mejor los resultados, en ambos grupos se realizó una segunda clasificación. El grupo hCG se dividió en 12 yeguas que quedaron preñadas en el ciclo inducido (subgrupo hCG P) y en 9 yeguas que no lo hicieron en el mismo ciclo (subgrupo hCG NP); a su vez el grupo C se dividió en 10 yeguas preñadas en el ciclo en estudio (subgrupo C P) y 2 que no quedaron preñadas en el mismo ciclo (subgrupo C NP).

El tamaño folicular de los subgrupos hCG P, hCG NP, C P, y C NP, al inicio del estudio, se comparó mediante ANDEVA. Las variaciones en los valores de las [P₄] a través del período en estudio se evaluaron mediante ANDEVA para muestras repetidas. Se aplicó análisis de regresión para determinar el grado de asociación entre el tamaño folicular preovulatorio y el tamaño del CL y entre las [P₄] y el tamaño del CL. La capacidad de concepción y de mantención de preñez (Preñez / No Preñez) según grupo, se analizó a través del test exacto de una vía de Fisher. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando $p \leq 0,05$. Los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar.

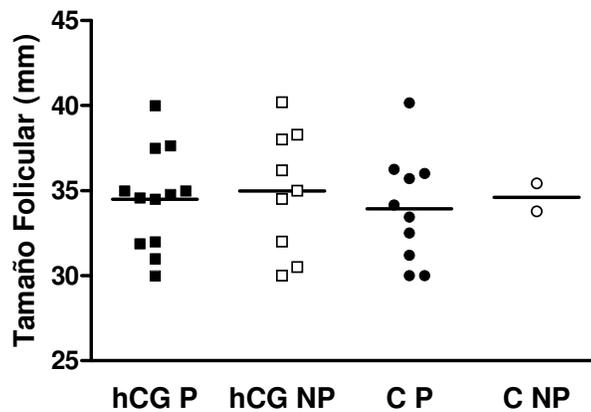
RESULTADOS

Tamaño Folicular

La distribución del tamaño folicular de las yeguas al inicio del celo se muestra en la Figura 1. El promedio para esta característica fue de $34,5 \pm 2,9$ mm; $34,1 \pm 5,4$ mm; $33,9 \pm 2,6$ mm; $34,2 \pm 1,1$ mm para los subgrupos hCG P, hCG NP, C P y C NP, respectivamente. No se observaron diferencias significativas para esta característica entre subgrupos.

FIGURA 1

Tamaño folicular por grupo el 1er día de celo en yeguas FSC tratadas y no tratadas con hCG.



El tamaño folicular preovulatorio fue significativamente menor ($p < 0,0001$) en el grupo hCG ($39,2 \pm 2,7$ mm) que en el grupo C ($51,0 \pm 1,8$ mm). Al comparar el tamaño folicular preovulatorio dentro del grupo hCG, éste fue significativamente menor en el subgrupo hCG P que en el hCG NP ($38,46 \pm 2,7$ mm v/s $40,4 \pm 2,2$ mm; $p = 0,046$). Entre el subgrupo C P y NP, no se detectaron diferencias.

Respuesta al tratamiento, duración del celo y número de montas

El total de yeguas tratadas con hCG ovuló 24 - 48 h después de haber aplicado el tratamiento hormonal.

La duración del celo en las yeguas del grupo hCG fue de $4,7 \pm 1,7$ días, sin diferenciarse de la duración del celo de las yeguas controles ($5,6 \pm 1,3$ días).

El número de montas por ciclo en el grupo hCG fue significativamente menor al del grupo control ($1,0$ v/s $2,0 \pm 0,8$ montas/ciclo; $p < 0,001$). El número de montas por preñez fue significativamente mayor en el grupo C en comparación con el hCG ($2,3 \pm 0,8$ v/s $1,9 \pm 0,6$ montas/preñez; $p = 0,010$).

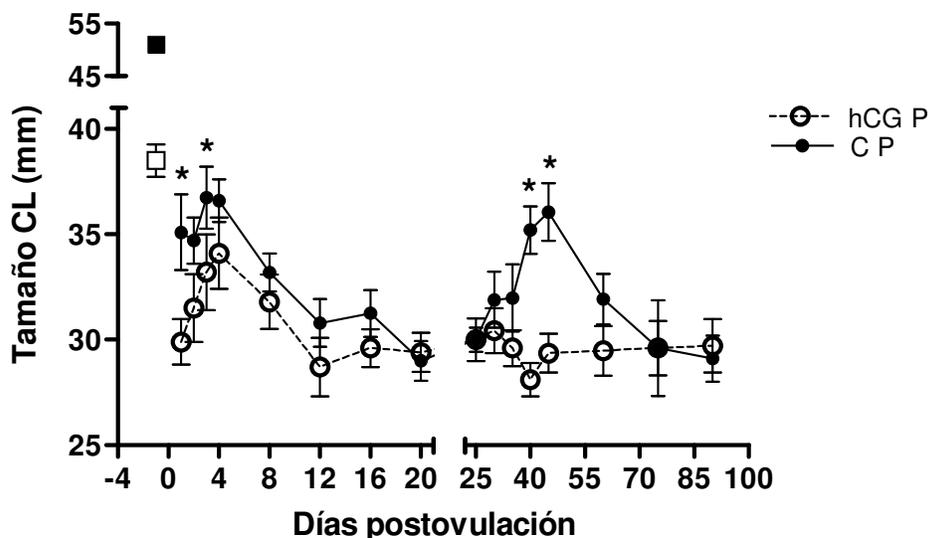
Tamaño del CL

El patrón del tamaño del CL de las yeguas preñadas, hCG P y C P, se presenta en la Figura 2. Se observa un crecimiento inicial de los CLs de ambos subgrupos hasta el día 5 Po, para luego disminuir paulatinamente hasta el día 20 de gestación. Aunque en esta primera etapa hay una tendencia a mayores tamaños en el subgrupo C P, sólo se observaron diferencias significativas en los días 1 y 3 (1 Po: hCG P: $29,85 \pm 3,7$ mm; C P: $35,2 \pm 6,6$ mm y 3 Po hCG P: $33,1 \pm 4,5$ mm; C P: $36,7 \pm 5,1$ mm). El día 25 de la gestación, el CL del subgrupo C P muestra otro episodio de crecimiento hasta el día 60, para luego decrecer.

A diferencia de las yeguas control, el subgrupo hCG P no mostró cambios en el tamaño del CL a partir del día 25 de la gestación.

FIGURA 2

Tamaño promedio del CL en yeguas FSC preñadas, tratadas y no tratadas con hCG.



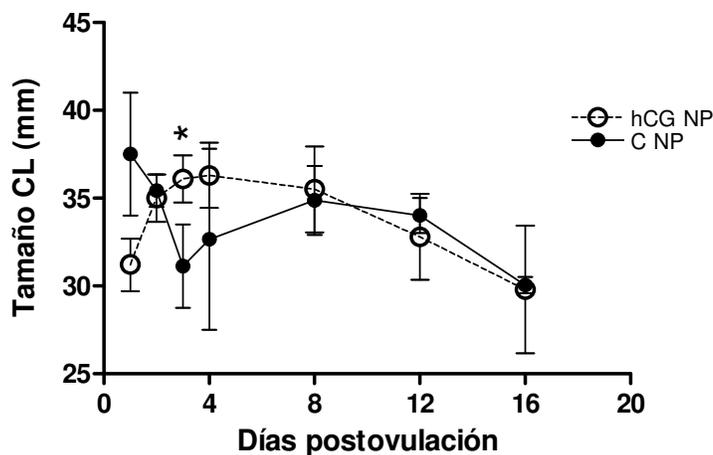
* : $p \leq 0,05$. Los cuadrados a la izquierda del gráfico corresponden al promedio del tamaño folicular preovulatorio, □ : subgrupo hCG P; ■ : subgrupo C P.

En el grupo hCG, el tamaño del CL no se diferenció significativamente entre las yeguas preñadas y no preñadas, desde el día 1 hasta el 16 Po. Durante el mismo periodo, tampoco varió el tamaño del CL entre las yeguas preñadas y no preñadas del grupo C.

El tamaño del CL en las yeguas no preñadas fue similar, excepto el día 3 Po, donde el tamaño del CL de las yeguas hCG NP fue significativamente mayor al de las yeguas C NP ($36,0 \pm 1,4$ mm y $31,1 \pm 3,4$ mm, respectivamente; $p = 0,03$) (Figura 3).

FIGURA 3

Tamaño promedio del CL en yeguas FSC no preñadas, tratadas y no tratadas con hCG.



* : $p \leq 0,05$

Concentración Plasmática de Progesterona

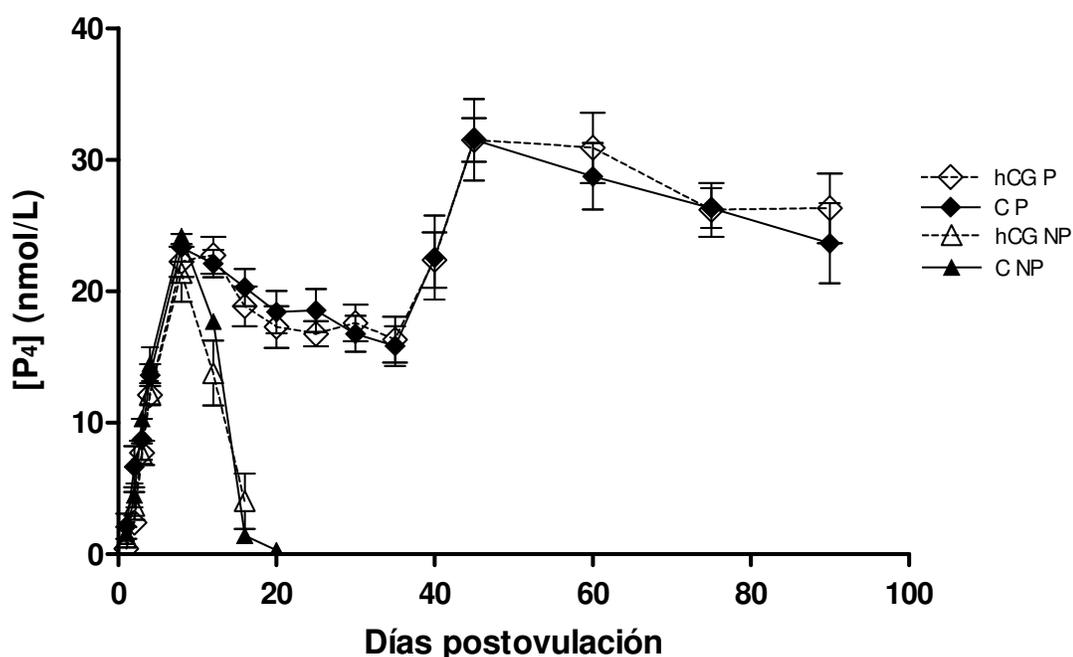
La $[P_4]$ comenzó a aumentar en todos los subgrupos, una vez ocurrida la ovulación, alcanzando una concentración máxima el día 8 Po (hCG P: $22,2 \pm 4,0$ nmol/L; hCG NP: $21,4 \pm 6,6$ nmol/L; C P: $23,3 \pm 3,3$ nmol/L; C NP: $24,2 \pm 0,2$ nmol/L), sin producirse diferencias significativas entre subgrupos. A partir de este día, las $[P_4]$ disminuyen, en los subgrupos hCG NP y C NP, el descenso es constante hasta alcanzar concentraciones basales alrededor de los días 16-20 (Figura 4).

En los subgrupos hCG P y C P, la $[P_4]$ se mantiene hasta el día 12 Po, luego disminuye levemente hasta el día 35 Po (hCG P: $16,3 \pm 6,0$ nmol/L; C P: $15,8 \pm 4,8$ nmol/L), sube nuevamente hasta el día 45 (hCG P: $31,5 \pm 5,7$ nmol/L; C P: $31,5 \pm 9,3$ nmol/L) y se mantiene hasta el día 60 (hCG P: $30,9 \pm 9,3$ nmol/L; C P: $28,7 \pm 7,6$ nmol/L).

A partir de este momento, comienza una disminución leve pero sistemática, llegando a concentraciones de hCG P: $26,3 \pm 9,2$ nmol/L y C P: $23,6 \pm 9,1$ nmol/L el día 90 de gestación. No se observaron diferencias en la $[P_4]$ entre ambos subgrupos (Figura 4).

FIGURA 4

Concentración plasmática de progesterona promedio en yeguas FSC, tratadas y no tratadas con hCG, preñadas y no preñadas.



Tamaño del Saco Gestacional

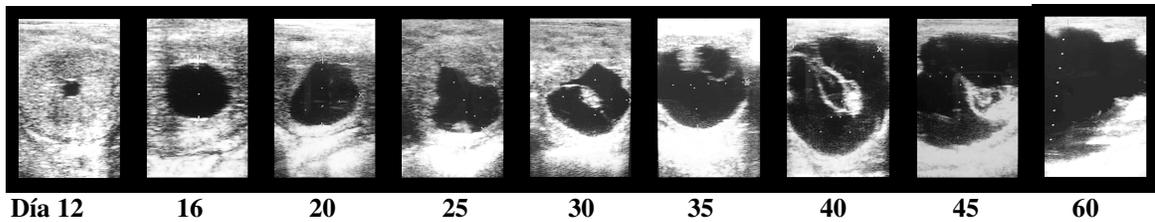
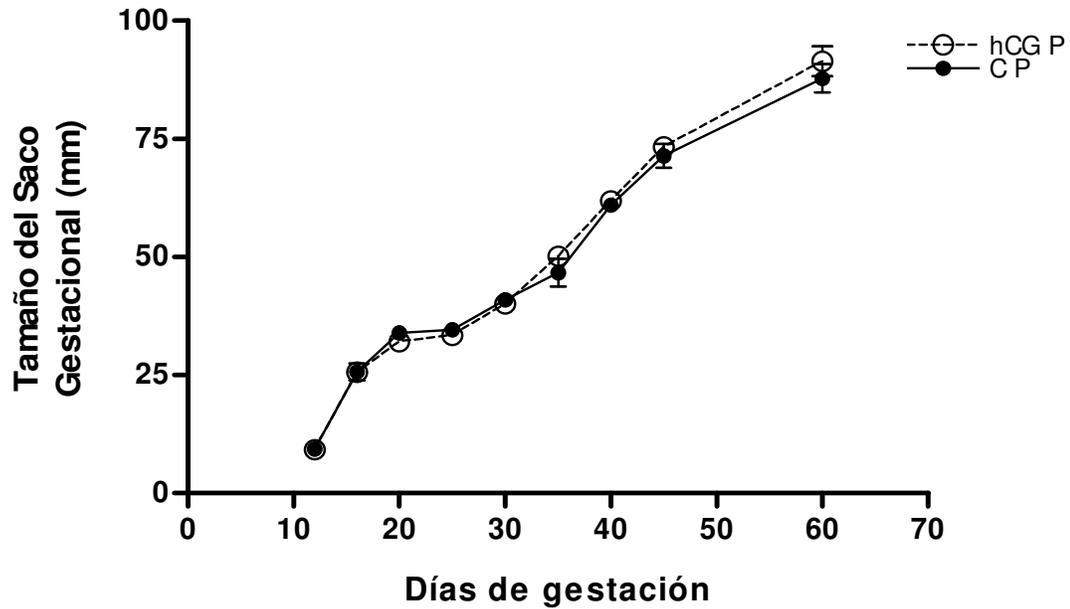
El tamaño del saco gestacional aumentó desde el día 12 hasta el día 20 de gestación, se mantuvo hasta el día 25 y luego aumentó sostenidamente hasta el día 90. No se detectaron diferencias significativas entre yeguas tratadas y controles, como se aprecia en la Figura 5.

Características del Saco Gestacional

Al igual que para el tamaño del saco gestacional, no se observaron diferencias para las distintas características evaluadas del saco gestacional entre el subgrupo hCG P y C P. En ambos subgrupos la primera detección del saco gestacional se realizó el día 12 Po (Figura 5, foto día 12), siendo éste esférico y generalmente ubicado en el cuerpo del útero. En 3 casos la detección del saco gestacional se pudo realizar recién el día 14 Po. Desde el día 16 en adelante el saco gestacional se fijó en la base de uno de los cuernos uterinos y se mantuvo en esa ubicación. Creció en forma similar entre grupos y a partir del día 20 cambió su forma esférica a una más irregular (Figura 5, foto día 20). En algunas yeguas fue posible detectar el embrión desde el día 20. En la totalidad de las yeguas el día 25 de gestación el embrión se encontró en la base del saco gestacional y con latido cardíaco detectable (Figura 5, foto día 25). Entre el día 25 y 30 se hizo notoria la membrana corioalantoidea (Figura 5, foto día 30), detectando un desplazamiento hacia dorsal del embrión desde el día 25 al 35 de gestación (Figura 5, foto día 25 - 35). Desde el día 40, el feto comienza a descender dentro del saco gestacional, pudiendo observar el cordón umbilical (Figura 5, foto día 40 a 60). En todas las yeguas entre el día 45 y 60 el feto se ubicó en la base del saco gestacional (Figura 5, foto día 45 y 60). A partir del día 60 de gestación debido al gran tamaño del saco gestacional, éste no pudo evaluarse ni medirse en su totalidad. En todos los casos el líquido amniótico, anecoico y de características normales, fue aumentando paulatinamente mientras se desarrollaba la gestación.

FIGURA 5

Tamaño y evolución ecográfica del saco gestacional en yeguas FSC, tratadas y no tratadas con hCG.



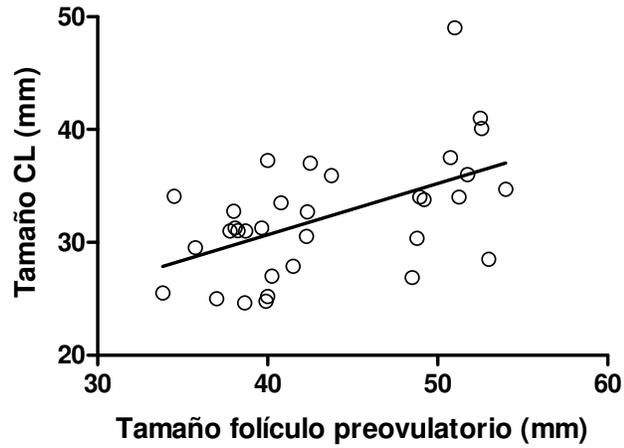
Relación entre el tamaño folicular y el tamaño del CL

El tamaño de CL en el primer día Po, se relacionó débil pero positivamente con el tamaño folicular preovulatorio ($r^2 = 0,278$; $p = 0,002$; Figura 6(a)). El segundo día Po, la relación no fue significativa ($r^2 = 0,085$; $p = 0,099$; Figura 6(b)). Tampoco se detectó relación entre ambos parámetros los días posteriores.

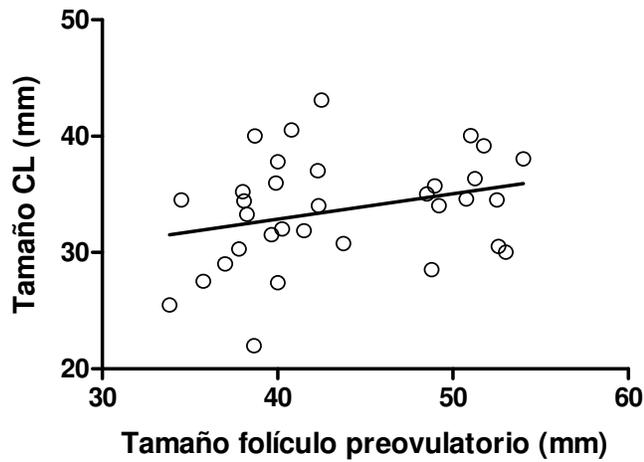
FIGURA 6

Regresión entre tamaño del cuerpo lúteo el 1er día Po (a) y 2do día Po (b) v/s el tamaño folicular preovulatorio.

(a)



(b)

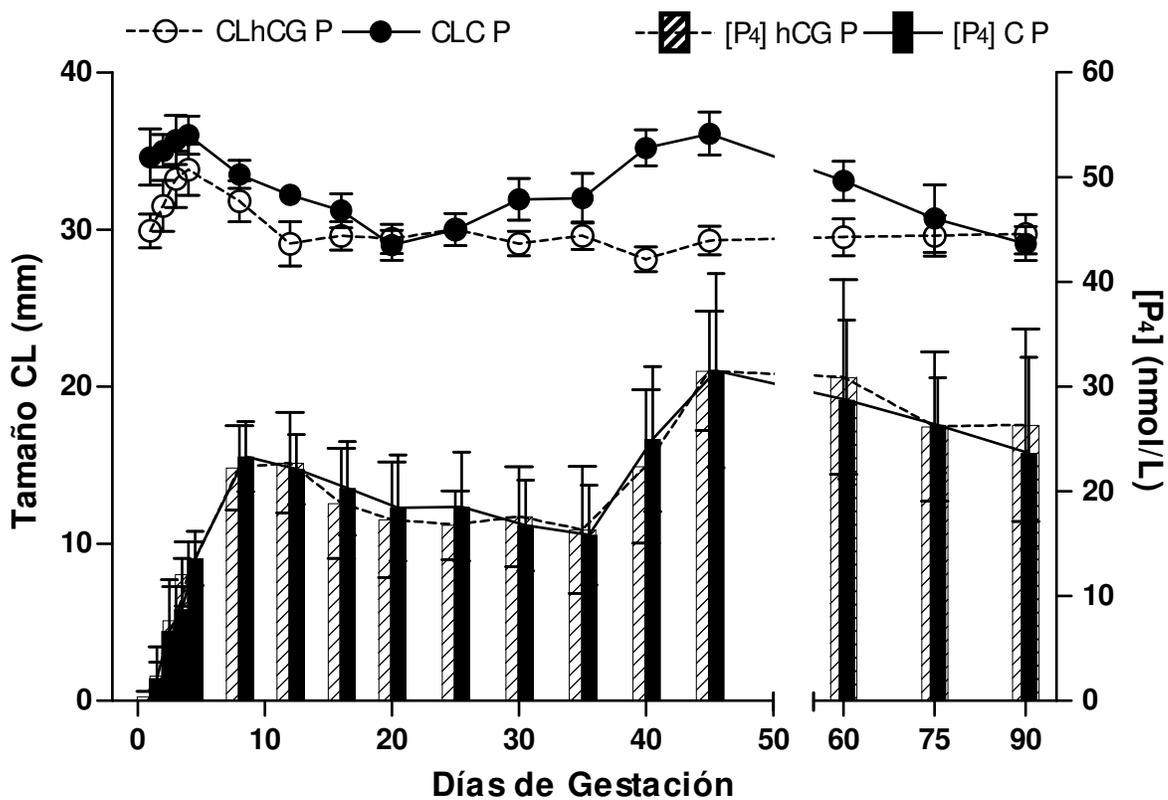


Relación entre el tamaño del CL y la [P₄]

En la Figura 7 se muestra los patrones de [P₄] y del tamaño del CL en yeguas preñadas, donde se observa una aparente relación de estas variables en el grupo C. Sin

embargo, al realizar análisis de regresión entre el tamaño del CL y la $[P_4]$ en cada subgrupo, no se detectó relación entre ambas variables en los subgrupos hCG P: $r^2 = 0,02$; $p = 0,07$; C P: $r^2 = 0,006$; $p = 0,38$; y C NP: $r^2 = 0,04$; $p = 0,55$. En el subgrupo hCG NP, se detectó una relación positiva, pero de escasa magnitud, entre ambas variables ($r^2 = 0,09$, $p = 0,03$).

FIGURA 7
Tamaño del CL y concentración plasmática de progesterona, en yeguas FSC preñadas, tratadas y no tratadas con hCG.



Tasa de Preñez

1) Tasa de Preñez por Ciclo

Durante el ciclo en estudio, 12 de 21 yeguas tratadas con hCG y 10 de 12 yeguas controles quedaron preñadas, lo que representa una tasa de preñez al primer ciclo de 57,1% y 83,3%, respectivamente. No se observó diferencia significativa entre grupos, sin embargo, en términos absolutos, el grupo hCG presentó un 26,2% menos de preñez que el grupo C.

2) Tasa de Preñez por Temporada

Al considerar toda la temporada en que se realizó el estudio, 18 de 21 yeguas tratadas con hCG y 11 de 12 yeguas controles quedaron preñadas, siendo la tasa de preñez para la temporada de 85,7% en el grupo hCG y de 91,6% en el grupo C. Esta diferencia del 5,9% no resultó ser significativa.

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio realizado en nuestro país que determina, en yeguas FSC, mantenidas bajo las mismas condiciones, el efecto de la inducción temprana de la ovulación con hCG, sobre el tamaño del CL y la [P₄] desde la ovulación hasta el día 90 de gestación. La mayoría de los estudios encontrados en la literatura sólo evalúan el efecto ovulatorio de la hormona y la tasa de preñez obtenida después de su uso. Es así que Voss *et al.* (1974) y McCue *et al.* (2004) evaluaron la efectividad de una dosis de hCG 24 h previo a la inseminación para inducir la ovulación y así acortar el estro, obteniendo tasas de preñez similares entre yeguas tratadas y controles. Bollwein y Braun (1999), detectaron que en presencia de folículos preovulatorios que han alcanzado un tamaño mínimo, existe una respuesta satisfactoria al tratamiento con hCG, sin afectarse la tasa de preñez. Un estudio retrospectivo realizado por Zúñiga (2005), detectó una respuesta positiva al estímulo ovulatorio, sin efecto negativo sobre las tasas de preñez, sin embargo, las yeguas tratadas con hCG presentaron mayor porcentaje de pérdidas embrionarias y menor tasa de parición respecto a las no tratadas.

En el presente estudio, el total de las yeguas tratadas con hCG ovuló 24 a 48 h después de haber recibido el tratamiento, presentando una duración de celo que puede ser considerada inferior a la del grupo control ($p = 0,06$), concordando con Voss *et al.* (1974), Webel *et al.* (1977) y Watson y Hinrichs (1988).

El primer día de celo, las yeguas de ambos grupos (hCG y C) presentaron tamaños foliculares similares, por lo cual se puede concluir que ambos grupos en estudio partieron en las mismas condiciones.

El tamaño folicular preovulatorio de las yeguas tratadas con hCG fue significativamente menor al de las yeguas controles, lográndose la ovulación inducida con tamaños foliculares menores que por la ovulación espontánea, consistente con lo descrito por Bollwein y Braun (1999). El tamaño folicular preovulatorio del grupo C fue similar al indicado por LeBlanc (1998) para el tamaño folicular al momento de la ovulación espontánea (45 - 65 mm) en yeguas de 400 - 550 Kg. Es importante mencionar que el tamaño preovulatorio alcanzado por las yeguas inducidas, en el presente estudio, fue similar al obtenido en otros estudios sobre el uso de hCG para inducir la ovulación en yeguas (Watson y Hinrichs, 1988; Bollwein y Braun, 1999; Kerban *et al.*, 1999 y Mc Cue *et al.*, 2004).

La tasa de preñez al inducir la ovulación con hCG en el segundo celo postparto, aun cuando no mostró diferencias significativas, en términos absolutos fue menor en un 26,2% en relación a las yeguas controles (83,3 % hCG v/s 57,1 % C), lo cual difiere del 61,1% de tasa de preñez por ciclo obtenida por Voss *et al.* (1974), como también del 44,4% de tasa de preñez por ciclo obtenida por Bollwein y Braun (1999).

Al comparar la tasa de preñez por temporada, no existen diferencias significativas entre el grupo hCG y C, encontrándose los valores obtenidos dentro del rango de 75 a 90% descrito como normal por Pycock (2000). Además, la tasa de preñez por temporada

obtenida por el presente estudio es similar al 94,4% de tasa de preñez al tercer ciclo obtenida por Voss *et al.* (1974), habiendo inducido la ovulación con hCG en el primer ciclo. Esto nos permite concluir que la menor tasa de preñez observada en el ciclo inducido, no se debe a causas individuales, efectos estacionales, ni tampoco a deficiencias en las [P₄], sino más bien a un efecto propio, pero aún indeterminado, del tratamiento con hCG, ya que la mayoría de las yeguas que no quedaron preñadas en ese ciclo (6 de 9), sí lo hicieron en el ciclo siguiente, donde no recibieron el tratamiento y ovularon espontáneamente con tamaños foliculares preovulatorios mayores.

El número de montas por ciclo y por preñez fue significativamente menor en el grupo hCG, concordando con una de las justificaciones entregadas por Intervet (s.f.) para el uso de hCG en yeguas, logrando un aparente uso más racional del potro en yeguas tratadas con hCG.

Sólo en los días 1, 3, 40 y 45 Po, el tamaño del CL fue significativamente menor en las yeguas en las cuales se indujo la ovulación de folículos de tamaño inferior al ovulatorio normal. Según estos resultados, lo planteado por nuestra hipótesis se cumple parcialmente, debido a que, a pesar de que el tamaño del CL proveniente de folículos de tamaño inferior al ovulatorio normal es menor al tamaño de los CLs de las yeguas controles en los primeros días Po, esta diferencia no se mantiene en el tiempo, ya que a partir del día 4 Po no se detectaron diferencias en el tamaño del CL entre yeguas inducidas y controles.

La diferencia en el tamaño del CL observada los días 1 y 3 Po concuerda con lo publicado por Bergfelt (2000), quien afirma que el tamaño máximo del CL representa

alrededor del 65 a 80% del tamaño del folículo preovulatorio. La ausencia de diferencia en el tamaño del CL entre el grupo hCG y C, presente luego de los primeros días Po, posiblemente se deba a una maduración y reorganización del CL. A partir del día 4 Po no se detectan diferencias ni en tamaño, ni en capacidad esteroidogénica.

A pesar de encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño del CL de yeguas inducidas y controles los días 40 y 45 de gestación, desde un punto de vista biológico y funcional su relevancia es menor, dado que ya desde el día 40 las diferencias en tamaño del CL primario son menos importantes, dado que su función esteroidogénica es complementada por la actividad de los CL_s secundarios, como se evidenció en las [P₄], que no variaron en este periodo.

La [P₄] encontrada en este estudio durante la gestación temprana fue similar a la descrita por Ganjam *et al.* (1975). Un patrón de progesterona plasmática diferente fue descrito por Burns y Fleeger (1975), donde la [P₄] aumenta hasta el día 5 Po, alcanzando concentraciones de 13 ng/mL (41 nmol/L), se mantiene hasta el día 30 y luego vuelve a subir. Asimismo, Holtan *et al.* (1975) describe que las [P₄] aumentan hasta el día 8 Po, luego disminuyen hasta el día 28, volviendo a aumentar hasta el día 60. En nuestro estudio, las [P₄] aumentaron rápidamente los primeros días Po, alcanzando concentraciones alrededor de 22 nmol/L el día 8 Po.

En las yeguas no preñadas, desde el día 8 Po, la [P₄] decrece alcanzando niveles basales los días 16 – 20 Po. Este descenso se explica por la ausencia de embrión y, por lo tanto, falta del estímulo antiluteolítico, como lo describen Van Niekerk *et al.* (1975).

En las yeguas preñadas, inducidas y controles, la [P₄] disminuye después del día 12 hasta el día 35 y luego aumenta hasta el día 45, alza asociada posiblemente al desarrollo de los CLs secundarios o accesorios, en respuesta a la secreción de eCG por las copas endometriales a partir de los días 35 – 40 de gestación (Ginther, 1992).

La [P₄] de las yeguas preñadas se mantuvo hasta el día 60, luego disminuyó hasta el día 90, siguiendo un patrón similar al descrito por Holtan *et al.* (1975) a partir del día 60 de gestación.

Las máximas [P₄] alcanzadas por el presente estudio el día 45 de gestación ($31,5 \pm 5,7$ nmol/L y $31,5 \pm 9,3$ nmol/L, en hCG P y C P, respectivamente), son menores a las detectadas por Holtan *et al.* (1975), el día 64 de gestación (48 nmol/L), como también a las máximas [P₄] encontradas por Burns y Fleeger (1975) el día 80 de gestación (79 nmol/L). Estas diferencias podrían deberse a las diferentes metodologías aplicadas para medir la [P₄].

En el presente estudio, a pesar de lo esperado, no se detectaron diferencias significativas entre las [P₄] de yeguas preñadas, inducidas y controles, como tampoco entre yeguas inducidas y controles no preñadas. Esto, sumado a los resultados para los tamaños del CL, rechaza la hipótesis planteada por nuestro estudio inicialmente, debido a que, a pesar de que los CLs provenientes de folículos de tamaño inferior al ovulatorio normal fueron más pequeños que los controles el día 1 y 3 Po, los días posteriores no se detectaron diferencias. Además, independientemente del tamaño del CL detectado, las [P₄] fueron

iguales entre grupos, concluyendo que la inducción temprana de la ovulación no tiene efecto sobre la [P₄] al inicio de la preñez en yeguas FSC.

Los resultados demuestran, además, que el tamaño del CL no tiene un efecto directo sobre su capacidad esteroidogénica, contradiciendo lo publicado por Hafez (1987) y Ginther (1992), quienes sugirieron que cambios estructurales del CL están altamente correlacionados con cambios funcionales del mismo y, por ello, la determinación ultrasonográfica del tamaño y ecogenicidad del CL podrían usarse como una medida indirecta de la productividad de la glándula luteal (capacidad de producción de progesterona).

La capacidad para mantener la gestación fue igual en ambos subgrupos (hCG P y C P). Datos posteriores a la finalización del presente estudio, indican que hasta el séptimo mes de gestación las tasas de preñez se han mantenido sin variación. Una vez que las yeguas, hCG y Control, quedaron preñadas, independientemente del tamaño de su CL, presentaron la misma [P₄] y mantuvieron la preñez hasta finalizar el estudio. Sólo una yegua, del grupo control, perdió su preñez el día 45 de gestación, sin antes presentar un descenso de su [P₄], permitiendo descartar la deficiencia de progesterona como posible causa de la pérdida de preñez. Esto coincide con Irvine *et al.* (1990), quienes describieron que del 10 % de yeguas que normalmente pierden la preñez entre los días 18 y 45, rara vez estas pérdidas se asocian a una insuficiente [P₄], tanto así, que incluso la administración exógena de la hormona en yeguas con historia previa de pérdidas tempranas de preñez, podría ser deletérea, al causar retención de contenidos uterinos y cierre del cérvix.

Debido a que la posible deficiencia esteroidogénica del CL, en respuesta a la inducción de folículos de tamaño inferior al ovulatorio normal, fue descartada al analizar nuestros resultados, se debe indagar en otras causales del efecto negativo obtenido por la aplicación de la hCG.

Estudios realizados por Goudet *et al.* (1997 y 1998) podrían explicar la menor tasa de preñez obtenida al inducir tempranamente la ovulación. En estos trabajos se determinó que la adquisición de la competencia meiótica del oocito necesaria para la fertilización, ocurre progresivamente durante el crecimiento antral del folículo, determinando que la competencia oocitaria está fuertemente influenciada por el estado del ciclo estral y por el diámetro folicular. Es por ello, que oocitos provenientes de folículos preovulatorios al final del estro (de diámetro mayor a 35 mm) presentan una tasa de maduración considerablemente mayor a aquellos provenientes de folículos de menor diámetro (Goudet *et al.*, 1998). En el presente estudio los tamaños foliculares alcanzados por las yeguas a las cuales se indujo la ovulación con hCG, fueron mayores a 35 mm, pero se debe considerar que el tamaño folicular alcanzado en las yeguas depende del tamaño corporal de ésta, siendo mayores los tamaños ovulatorios para yeguas FSC, pudiendo ser la inmadurez oocitaria una posible explicación para las menores tasas de preñez obtenidas. Además, en yeguas pesadas no todos los folículos de mayor tamaño están destinados a ovular. Algunos de éstos podrán crecer y sufrir expansión del cúmulo oóforo, pero sus oocitos no necesariamente podrán completar la maduración requerida para ser fertilizados (Goudet *et al.*, 1997).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el principal resultado de nuestro estudio es que, a pesar de lograr la ovulación temprana en las yeguas inducidas con hCG, generando inicialmente CLs de tamaño menor al normal, pero de capacidad esteroidogénica adecuada, un alto porcentaje de éstas no quedan preñadas, afectando negativamente la productividad del criadero y retrasando toda la temporada reproductiva. Debido a que las yeguas inducidas que no se preñaron, deben ser esperadas hasta entrar nuevamente en celo, realizando todos los esfuerzos y manejos necesarios para que queden preñadas en el ciclo siguiente, generando una pérdida de tiempo considerable (alrededor de 20 a 30 d) y haciendo menos eficiente el funcionamiento del criadero, al generar los productos más tardíamente en la temporada.

Finalmente, tomando las precauciones necesarias y teniendo siempre en cuenta los registros de cada yegua (como por ejemplo, el tamaño folicular al momento de la ovulación espontánea en ciclos anteriores), en casos puntuales (alta demanda del potro, disfunciones ováricas, necesidad de acelerar la ovulación al final de la temporada reproductiva o en programas de inseminación artificial), el uso de la hCG puede ser una alternativa terapéutica válida. No así, el uso rutinario y masivo de la hCG en un haras de crianza, que maneja yeguas clínica y reproductivamente sanas, pudiendo impactar negativamente la eficiencia reproductiva del criadero.

CONCLUSIÓN

La inducción de la ovulación con hCG en yeguas FSC, genera CLs más pequeños los primeros días Po, sin afectar la [P₄] como tampoco la capacidad de mantener la gestación. A pesar de ello, hay una tendencia a la disminución de la tasa de preñez por ciclo, pudiendo afectar negativamente la eficiencia reproductiva del criadero.

Los resultados del presente estudio indican que al manejar yeguas sanas, la hCG no debe usarse en forma masiva e indiscriminada, con la finalidad de evitar riesgos eventuales sobre la fertilidad.

BIBLIOGRAFÍA

BERGFELT, D.R. 2000. Anatomy and physiology of the mare (Chapter 11). **In:** Equine Breeding Management and Artificial Insemination. Samper, J.C. W.B. Saunders Company. Philadelphia. USA. pp. 165 - 177.

BOLLWEIN, H.; BRAUN, J. 1999. Follikeldynamik nach Anwendung von hCG für die Ovulationsinduction bei der Stute. Tierarztl. Prax. Ausg. G. Grosstiere Nutztiere 27: 47 – 51.

BURNS, S.J.; FLEEGER, J.L. 1975. Plasma progestagens in the pregnant mare in the first and last 90 days of gestation. J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 435 – 439.

DAELS, P.F. 2004. Hormonal therapy in pregnant mare. [en línea] <<http://www.ivis.org/proceedings/SIVE/2004/lectures/daels2.pdf>> [consulta: marzo, 2006].

DÍAZ, O.H. 1995. Estudios sobre gestación. (Capítulo 12). **En:** Reproducción, crianza y manejo en el caballo Fina Sangre de Carrera. Díaz, O.H. 1ª ed. Ediciones Sigma. Santiago, Chile. pp. 321 – 323.

FRAZER, G.S. 2004. Disorders of the reproductive system (Chapter 16). **In:** Equine internal medicine. Bayly, W.M.; Reed, S.M.; Sellon, D. 2ª ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia. USA. pp. 1025 - 1130.

GANJAM, V.K.; KENNEY, R.M.; FLICKINGER, G. 1975. Plasma progesterone in cyclic, pregnant and post-partum mares. J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 441 - 447.

GINTHER, O.J. 1992. Ultrasonic imaging and animal reproduction: Horses. Cited by Bergfeld, D.R. 2000. Anatomy and physiology of the mare. **In:** Equine breeding management and artificial insemination. W.B. Saunders Company. Canada. pp. 141 - 164.

GOUDET, G.; BÉZARD, J.; DUCHAMP, G.; GÉRARD, N.; PALMER, E. 1997. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: effect of follicle size and hormonal environment. Biol. Reprod. 57: 232 – 245.

GOUDET, G.; BÉZARD, J.; BELIN, F.; DUCHAMP, G.; PALMER, E.; GÉRARD, N. 1998. Oocyte competence for in vitro maturation is associated with histone H1 kinase activity and is influenced by estrous cycle stage in the mare. Biol. Reprod. 59: 456 – 462.

HAFEZ, E.S.E. 1987. Horses (Capítulo 16). **In:** Reproduction in farm animals. E.S.E. Hafez. 5ª ed. Lea and Febiger. Philadelphia. USA. pp. 345 – 362.

HOLTAN, D.W.; NETT, T.M.; ESTERGREEN, V.L. 1975. Plasma progesterone in pregnant mares. J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 419 – 424.

INTERVET. s.f. Chorulon. [en línea] <<http://www.ceba.com.co/intervetnew2.html>> [consulta: marzo, 2006].

IRVINE, C.H.G.; SUTTON, P.; TURNER, J.E.; MENNICK, P.E. 1990. Changes in plasma progesterone concentrations from days 17 to 42 of gestation in mares maintaining or loosing pregnancy. *Equine Vet. J.* 22: 104 – 106.

KERBAN, A.; DORE, M.; SIROIS, J. 1999. Characterization of cellular and vascular changes in equine follicles during hCG-induced ovulation. *J. Reprod. Fert.* 117: 115 – 123.

KILICARSLAN, M.R.; HOROZ, H.; SENUNVER, S.C.; KONUK, C.; TEK, C.; CARIOGLU, B. 1996. Effect of GnRH and hCG on ovulation in mares. *Vet. Rec.* 139: 119 – 120.

LEBLANC, M.M. 1998. Enfermedades del aparato reproductivo: La yegua. **En:** Colahan, P.T.; Mayhew, I.G.; Merrit, A.M.; Moore, J.N. *Medicina y Cirugía Equina*. 4ª ed. Inter-Médica. Buenos Aires, Argentina. pp. 899 – 989.

MALINOWSKI, K. 1993. Recent advances in reproduction in horses. [en línea] <<http://www.rcrc.rutgers.edu/pubs/publication.asp?pid=FS717>> [consulta: marzo, 2006].

MC CUE, P.; HUDSON, J.J.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. 2004. Efficacy of hCG at Inducing Ovulation: A new look at an old issue. [en línea] <<http://www.ivis.org/proceedings/AAEP/2004/McCue/chapter.asp?LA=1>> [consulta: marzo, 2006].

MC DONALD, L.E. 1991. Patrones reproductivos de los caballos. (Capítulo 13). **En:** Endocrinología Veterinaria y Reproducción. Mc Donald, L.E. 4ª ed. Interamericana Mc Graw-Hill. México DF. México. pp. 404 – 415.

MEYERS, P.J. 1997. Control and synchronization of the estrous cycle and ovulation. **In:** Current Therapy in Large Animal Theriogenology. Youngquist, R.S. W.B. Saunders Company. Philadelphia. USA. pp. 96 – 102.

MURDOCH, W.J.; VAN KIRK, E.A. 1998. Luteal dysfunction in ewes induced to ovulate early in the follicular phase. Endocrinology 139: 3480 – 3484.

NODEN, P.A.; OXENDER, W.D.; HAFS, H.D. 1975. The cycle of oestrus, ovulation and plasma levels hormone in the mare. J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 189 – 192.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. 1985. Ultrasonic evaluation of the preovulatory follicle in the mare. Theriogenology 24: 359 – 368.

PYCOCK, J.F. 2000. Management of the problem mare (Chapter 14). **In:** Equine Breeding Management and Artificial Insemination. Samper, J.C. W.B. Saunders Company. Philadelphia. USA. pp. 195-228.

REIMERS, T. 1991. Effects of hemolysis and storage on quantification of hormones in blood samples from dogs, cattle, and horses. Am. J. Vet. Res. 52: 1075 – 1080.

SLUSHER, S.H.; TAYLOR-MACALLISTER, C.; FREEMAN, D.W. s.f. Reproductive management of the mare. Oklahoma State University. [en línea] <http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-2092/F-3974web.pdf> [consulta: noviembre, 2006].

SMITH, M.F.; MC INTUCH, E.W.; SMITH, G.W. 1994. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J. Anim. Sci.* 72: 1857 – 1872.

STABENFELDT, G.H.; HUGHES, J.P.; EVANS, J.W.; GESCHWIND, I.I. 1975. Unique aspects of the reproductive cycle of the mare. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 23: 155 – 160.

VAN NIEKERK, C.H.; MORGENTHAL, J.C.; GERNEKE, W.H. 1975. Relationship between the morphology of and progesterone production by the corpus luteum of the mare. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 23: 171 – 175.

VASCONCELOS, J.L.M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H.N.; GUENTHER, J.G.; WILTBANK, M.C. 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56: 307 – 314.

VOSS, J.L.; PICKETT, B.W.; BURWASH, L.D.; DANIELS, W.H. 1974. Effect of human chorionic gonadotropin on duration of estrous cycle and fertility of normally cycling, nonlactating mares. *JAVMA*, 165: 704 – 706.

VOSS, J.L.; SULLIVAN, J.J.; PICKETT, B.W.; PARKER, W.G.; BURWASH, L.D.; LARSON, L.L. 1975. The effect of hCG on duration of oestrus, ovulation time and fertility in mares. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 23: 297 – 301.

WATSON, E.D.; HINRICHS, K. 1988. Changes in concentration of steroids and prostaglandin F in preovulatory follicles of the mare after administration of hCG. *J. Reprod. Fert.* 84: 557 – 561.

WEBEL, S.K.; FRANKLIN V.; HARLAND, B.; DZIUK, P.J. 1977. Fertility, ovulation and maturation of eggs in mares injected with HCG. *J. Reprod. Fert.* 51: 337 – 341.

ZÚÑIGA, M^a PAZ. 2005. Fertilidad en yeguas fina sangre de carrera, posterior al uso de gonadotropina coriónica humana. Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias. 47 p.