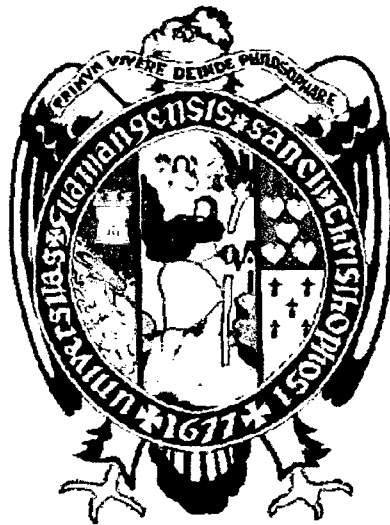


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE MEDICINA

VETERINARIA



**“ACETATO DE DESLORELINA PARA ESTIMULAR CRECIMIENTO
FOLICULAR MÚLTIPLE EN YEGUAS DE RAZA PERUANO DE PASO-
Criaderos MONTALVAN Y FESA. Lurín – Lima. 2012”**

**Tesis para obtener el Título Profesional de
MÉDICO VETERINARIO**

Presentado por:

Adela Cintya VÁSQUEZ GÓMEZ

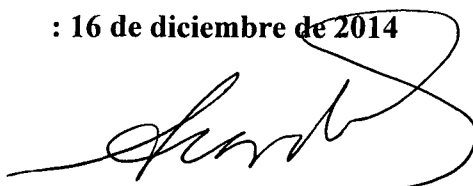
AYACUCHO – PERÚ

2014

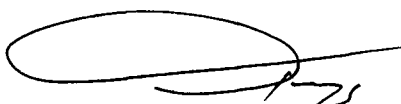
“ACETATO DE DESLORELINA PARA ESTIMULAR EL CRECIMIENTO FOLICULAR MÚLTIPLE EN YEGUAS DE RAZA PERUANO DE PASO – CRIADEROS MONTALVAN Y FESA – LURIN – LIMA – 2012”

Recomendado : 28 de noviembre de 2014

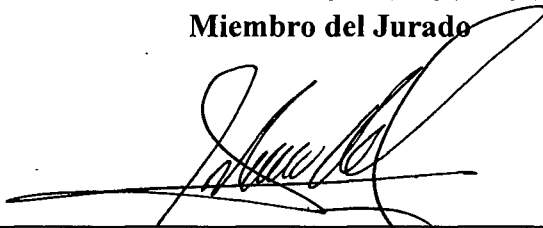
Aprobado : 16 de diciembre de 2014



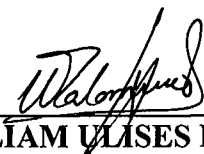
M.Sc. ALFREDO SALVADOR CORDOVA LÓPEZ
Presidente del Jurado



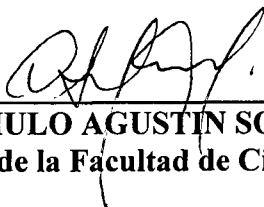
M.Sc. CARLOS ALBERTO PISCOYA SARMIENTO
Miembro del Jurado



Dr. LUIS ARTURO RODRIGUEZ ZAMORA
Miembro del Jurado



M.V. WILLIAM ULISES PALOMINO CONDE
Miembro del Jurado



Dr. ROMULO AGUSTIN SOLANO RAMOS
Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias

DEDICATORIA

A usted, que guía mi vida, que coadyuva en mi formación; a usted, cuya presencia representa amor y felicidad permanente; a usted, por quien verdaderamente vale luchar y ser grande en esta vida; mi reina con coronita invisible, a ti Mamita Valeria, autora de mi existencia y responsable de escribir estas líneas. Soy inmensamente feliz, TE AMO.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, mi alma mater, a la Facultad de Ciencias Agrarias, a la gloriosa Escuela de Formación Profesional de Medicina Veterinaria y a los docentes que me brindaron conocimientos y experiencias.

Al Médico Veterinario Carlos Alberto Piscoya Sarmiento, docente de la E.F.P., asesor de mi tesis, por brindarme su tiempo, conocimientos, paciencia y consejos, para el éxito del presente trabajo de investigación.

Al Médico Veterinario Christian Torres Ruiz, Co-Asesor de la presente investigación, por su invaluable apoyo, constante en el tiempo y firme en todo momento.

Al Médico Veterinario Julio Ruiz Maquén por su gran voluntad y disposición en momentos decisivos.

Al Sr. Felipe Thordike, por brindarme las instalaciones del fundo "Montalvan" y a sus valiosos ejemplares caballares para la ejecución de la investigación.

A los Médicos Veterinarios, Ingenieros Zootecnistas y demás profesionales que en el camino de la ejecución de este trabajo compartieron conocimientos, experiencias y palabras de aliento.

A Yuly Valeria y Oscar Augusto, por su incondicionalidad, paciencia y amor.

RESUMEN

El trabajo titulado "ACETATO DE DESLORELINA PARA ESTIMULAR CRECIMIENTO FOLICULAR MÚLTIPLE EN YEGUAS DE RAZA PERUANO DE PASO- Criaderos MONTALVAN y FESA. Lurín – Lima.2012" ejecutado en los criaderos Montalvan y FESA, ubicados en el distrito de Lurín, región Lima, a 250 m.s.n.m., entre los meses de marzo a mayo del 2012 tuvo como objetivo evaluar el efecto del uso de la hormona Acetato de desloreline (AD) en la estimulación del crecimiento folicular, la respuesta independiente de cada ovario al uso de la hormona AD y la eficiencia del uso de AD en función al tiempo de crecimiento folicular. Para tal efecto 107 yeguas peruano de paso cíclicas, fueron asignadas al azar en tres grupos: tratamiento 0 grupo control, compuesto por 95 yeguas; tratamiento 1 (T₁): 06 yeguas, a quienes el tercer día de encontrar cuerpo lúteo se les aplicó 0.263mg de Cloprostenol sódico vía IM y tres días después 0.825 mg de AD (cada doce horas) IM; el tratamiento2 (T₂) con 06 yeguas a las que se les repitió los primeros procedimientos del T1, y antes de iniciar la aplicación de AD (1.65 mg c/12hras) se corroboró la presencia de un folículo de diámetro \geq 25mm y un segundo folículo de por lo menos 20mm. El tratamiento con AD se suspendió al tercer día. Se concluye que el Acetato de desloreline es eficaz en la estimulación del crecimiento folicular múltiple en yeguas de raza peruano de paso mostrando una frecuencia de 33.33% para ovulaciones dobles, usando dosis de 1.65 mg, la respuesta independiente de cada ovario en relación al número de folículos en crecimiento es indistinta, el uso de Acetato de desloreline reduce en un 13.60 % el tiempo de crecimiento folicular en comparación con el grupo testigo y que las ovulaciones dobles espontáneas se presentaron con una frecuencia del 9.28%.

Palabras clave: **superovulación, acetato de desloreline, crecimiento folicular múltiple.**

ABSTRACT

The work entitled "deslorelin acetate TO STIMULATE GROWTH IN MULTIPLE FOLLICULAR YEGUAS RACE PERUVIAN Paso Breeders MONTALVAN and FESA. Lurin - Lima.2012 "executed in Montalvan and FESA farms, located in the district of Lurín, Lima region, 250 meters, between the months of March to May 2012 aimed to evaluate the effect of hormone use Acetate deslorelin (AD) in the stimulation of follicular growth, independent of each ovarian response to hormone use AD and AD use efficiency depending on the time of follicular growth. For this purpose 107 Peruvian step cyclic mares were randomized into three groups: control group treatment 0, consisting of 95 mares; Treatment 1 (T1): 06 mares, to find the third day of corpus luteum was applied Cloprostenol 0.263mg of sodium intramuscularly and three days after 0.825 mg of AD (every twelve hours) IM; the treatment2 (T2) with 06 mares which it was repeated the first procedures of T1, and before starting the implementation of AD (1.65 mg c / 12hras) the presence of a follicle diameter > 25mm and a second follicle confirmed of at least 20mm. AD treatment was discontinued on the third day. It is concluded that the Deslorelin acetate is effective in stimulating multiple follicular growth in mares Peruvian breed of step showing a frequency of 33.33% for double ovulation, using doses of 1.65 mg, independent response of each ovary in relation to the number of growing follicles is indistinct, the use of deslorelin acetate reduced by 13.60% time of follicular growth compared to the control group and double spontaneous ovulations occurred at a frequency of 9.28%.

Keywords: superovulation, deslorelin acetate, multiple follicular growth.

ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
INTRODUCCION	vii
CAPITULO I: REVISIÓN DE LITERATURA	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 El caballo peruano de paso	12
1.2.1 Importancia	13
1.3 Morfología y función del tracto reproductivo	14
1.4 Neuroendocrinología de la hembra	15
1.4.1 Hipotálamo	16
1.4.2 Hipófisis	16
1.4.3 Glándula pineal	17
1.5 Comunicación neuronal	17
1.5.1 Trayectoria neural	17
1.5.2 Mecanismos neurales	18
1.6 Hormonas	18
1.6.1 Hormonas primarias de la reproducción	21
1.6.1.1 Hormonas hipotalámicas liberadoras-inhibidoras	21
1.6.1.2 Hormonas adenohipofisiarias	22
1.6.1.3 Hormonas neurohipofisiarias	26
1.6.1.4 Hormonas esteroides gonadales	28
1.6.2 Hormonas sintéticas - Manejo hormonal	35
1.6.2.1 Acetato de deslorelina	35
1.7 Fisiología reproductiva	36
1.7.1 Foliculogénesis	36
1.7.2 Ciclo estral	37
1.7.3 Luteólisis	41

1.8	Inducción de ovulación múltiple	
	42	
1.9	Transferencia de embriones equinos (TEE)	45
1.9.1	Técnicas de transferencia de embriones	48
1.10	Diagnóstico ecográfico	53
1.10.1	Consideraciones del Procedimiento	54
1.10.2	Palpación rectal	55
1.10.2.1	Examinación de los Ovarios	57
1.10.2.2	Estimación de la etapa del ciclo	58
	CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS	60
2.1	Localización	60
2.2	Duración	60
2.3	Materiales	61
2.4	Procedimiento	62
2.4.1	Selección	62
2.4.2	Alimentación y sanidad	63
2.4.3	Sincronización de celo	65
2.4.4	Terapia hormonal	66
2.4.5	Control y evaluación ecográfica	68
2.5	Análisis estadístico	73
	CAPITULO II: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
3.1	Frecuencia de folículos ovulados	75
3.2	Número de ovulaciones	77
3.3	Período de crecimiento folicular	79
3.4	Período de ovulación	81
3.5	Actividad ovárica según ubicación del ovario	82
	CAPITULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	84
	CONCLUSIONES	84
	RECOMENDACIONES	84
	BIBLIOGRAFÍA	86
	ANEXOS	92

INTRODUCCIÓN

El caballo peruano de paso, embajador silencioso, producto bandera y patrimonio de la nación, es indudablemente un símbolo de nuestra cultura peruana, raza caballar formada a través del tiempo en la geografía de la costa de nuestro país, cuyo brío, nobleza y arrogancia, unidas a una buena disposición, son características que lo han convertido en uno de los mejores caballos de silla del mundo.

La biotecnología reproductiva en la especie equina ha permitido desarrollar métodos como la inseminación artificial, la transferencia de embriones, transferencia intratubárica de gametos, etc.; tecnologías que son utilizadas con éxito, pero que demandan conocimientos y estudios avanzados en la fisiología reproductiva, especialmente en lo que se refiere a los controles hormonales, con la finalidad de modificar el ciclo estral acorde a la conveniencia de los trabajos.

El bajo índice de ovulaciones por ciclo estral es la principal limitante para el trabajo con equinos, debido a la disposición anatómica que las predispone a ovulaciones únicas, por lo que a lo largo de mucho tiempo se viene investigando protocolos que permitan estimular a los ovarios a crecimientos foliculares múltiples, con la finalidad de obtener de dos a más ovulaciones por ciclo estral, óvulos que antes o después de ser fecundados pueden ser recuperados para su tratamiento *in vitro* o *in vivo* y posterior transferencia. Lo que llevaría a reducir los costos y elevar la eficiencia de esta técnica.

En el caballo de raza peruano de paso hay pocos trabajos relacionados, que han sido publicados, por lo que no conocemos un protocolo comercial que pueda utilizarse para estimular la superovulación, sin embargo, en nuestro medio, ya es frecuente la aplicación de biotecnologías como la transferencia de embriones que requieren de este conocimiento. Por ello planteamos el siguiente trabajo de investigación, que propone dos protocolos de tratamiento para estimular el crecimiento folicular múltiple a base de Acetato de deslorelina.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto del Acetato de deslorelina en la estimulación del crecimiento folicular múltiple en yeguas de raza peruano de paso.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Evaluar la respuesta independiente de cada ovario en relación con el número de folículos en crecimiento usando Acetato de deslorelina.

Evaluar la eficiencia del uso de Acetato de deslorelina en función al tiempo de crecimiento folicular.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LA LITERATURA

1.1 Antecedentes

1.1.1 Inducción de doble ovulación en yeguas usando acetato de deslorelina.

Este estudio, realizado con yeguas mangalarga marchador, en Brasil, tuvo como objetivo determinar si el acetato de deslorelina podría inducir la ovulación doble en yeguas. En el Experimento 1, ocho yeguas fueron tratadas con prostaglandina el día 8 (D8) después de la ovulación, después se trató con solución salina o con 100 ug de una formulación de liberación controlada de acetato de deslorelina por vía intramuscular (IM) cada 12 h desde el día 8 (D8) después de la ovulación hasta que al menos dos folículos alcanzaron 33 mm. En ese momento, la ovulación fue

inducida con 2500 UI de hCG. La inseminación artificial se realizó 24 horas después de la inducción, y los embriones fueron recolectados en el octavo día después de que se detectó la primera ovulación. En el experimento 2, 112 ciclos estrales en 56 yeguas fueron estudiados. En ese experimento, el protocolo de acetato de deslorelina sólo se inició en yeguas que alcanzaron un folículo con un diámetro de al menos 25 mm y al menos un segundo folículo detectado con un diámetro ≥ 20 mm, momento en el que 100 ug de acetato de deslorelina o solución salina se administró IM cada 12 h. Los otros procedimientos fueron similares a los descritos en el Experimento 1. Las variables estudiadas fueron analizadas mediante T de Student y la prueba exacta de Fisher. En el experimento 1, sólo dos yeguas en el grupo deslorelina tuvieron folículos secundarios de 20-25 mm que respondieron con doble ovulación. En el segundo experimento, 82% de las yeguas tratadas respondieron con doble ovulación, y la recuperación de embriones por ciclo estrual fue 1,12 y 0,57 en el grupo tratado con acetato de deslorelina y el grupo de control, respectivamente ($P < 0,05$). En promedio, se permite la recuperación de un embrión mediante lavado uterino (Nagao *et al.*, 2012).

1.1.2 Respuesta a superovulación ovárica y producción de embriones en yeguas tratadas con extracto de hipófisis equina EPE dos veces al día. Se realizaron dos experimentos para comparar la respuesta ovárica de yeguas cíclicas usando extracto de pituitaria equina (EPE) una vez y dos veces al día. Las yeguas fueron asignadas a uno de dos grupos de tratamiento de 6 a 8 días después de la ovulación: se

administró prostaglandina, y EPE (25 mg) se administró una vez al día (Grupo 1) o dos veces al día (Grupo 2). Más folículos de diámetro ≥ 35 mm ($P < 0,05$) se detectaron en las yeguas tratadas con EPE dos veces al día ($6,1 \pm 3,1$) que en yeguas tratadas una vez al día ($2,0 \pm 0,6$). El número de ovulaciones por yegua fue mayor ($P < 0,05$) para yeguas tratadas dos veces al día ($7,1 \pm 5,1$), que para yeguas tratadas una vez al día ($2,4 \pm 1,8$ rango de 1 a 6). El número de embriones producidos por yegua fue mayor ($P < 0,05$) en las yeguas del Grupo 2 (3,5) que en el Grupo 1 (1,6). Aunque no está claro si el aumento de la tasa de ovulación se debe específicamente a la dosis o a la frecuencia, la administración dos veces al día de una dosis alta de extracto de pituitaria equina mejora significativamente el desarrollo folicular, la ovulación y la recuperación de embriones en el tratamiento estándar de la inyección una vez al día (Alvarenga *et al.*, 2001).

1.1.3 Comparación de los efectos de la hormona folículo estimulante eFSH y regímenes de tratamiento con deslorelina en la estimulación ovárica y la producción de embriones de yeguas donantes en la transición de primavera temprana.

A partir del 30 de enero se mantuvo bajo luz ambiental a yeguas que fueron examinadas por ultrasonografía transrectal. Cuando se detectó un folículo ≥ 25 mm, las yeguas fueron asignadas a uno de dos grupos de tratamiento, utilizando un diseño de tratamiento secuencial alternante. En el grupo de yeguas eFSH, ($n = 18$) fueron tratadas dos veces al día con eFSH (12,5 mg IM) hasta lograr un folículo ≥ 35 mm; hCG fue aplicado

36h más tarde. En el grupo de yeguas deslorelina, (n = 18) fueron tratadas dos veces al día con deslorelina (63µg IM) hasta que se detectó un folículo ≥ 35 mm, y luego se aplicó hCG. Las yeguas en estro fueron inseminadas con semen fresco. Ocho días después de la ovulación, se realizaron intentos de recuperación de embriones. En cada grupo, 14/18 (78%) yeguas ovularon después de los regímenes de tratamiento deslorelina o eFSH. El intervalo medio (CI el 95%) del inicio del tratamiento hasta la ovulación era 8,2 días (7,3- 8,9) y 7,2 días (6,2- 8,1) en el grupo eFSH y deslorelina, respectivamente. En el grupo eFSH, el número de ovulaciones fue significativamente mayor (media \pm SEM; $3,4 \pm 0,4$ vs $1,1 \pm 0,1$ ovulaciones), y se recuperaron más embriones ($2,6 \pm 0,5$ vs $0,4 \pm 0,2$ embriones/intento de recuperación). Se llegó a la conclusión de que los regímenes de tratamiento con la hormona eFSH y deslorelina fueron igualmente efectivos en la inducción de la ovulación en yeguas de transición temprana, dentro de un tiempo previsible de tratamiento, sin embargo, el régimen eFSH aumentó el número de ovulaciones y embriones recuperados por yegua (Raz *et al.*, 2009).

1.1.4 Estrategias para mejorar la respuesta ovárica al extracto de hipófisis equina en yeguas cíclicas

Tres experimentos independientes se realizaron para mejorar la respuesta ovárica a extracto de pituitaria equina (EPE) mediante la evaluación de: (1) el efecto de aumentar la frecuencia o la dosis de tratamiento EPE; (2) el uso de un potente agonista de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH-a) antes de la estimulación EPE; (3) la administración de EPE dos

experimental fue de 2 ciclos de celo sucesivos, considerando el primer ciclo como control. En los días 6 y 7 del ciclo estral, las yeguas recibieron 250mg vía IM de cloprostenol. Los tratamientos consistieron en inyecciones diarias de 25 mg de eFSH o EPE en el día 6 después de la ovulación. Las yeguas fueron inseminadas cada dos días hasta que se detectó la última ovulación. Cuando las yeguas en los ciclos de control y tratamiento desarrollaron al menos 1 o 2 folículos ≥ 35 mm, respectivamente, se interrumpió el tratamiento, y se administró una única inyección de EPE (25 mg, IV) para inducir la(s) ovulación(es). La recuperación embrionaria no quirúrgica se realizó 6 o 7 días después de la ovulación, tanto en los ciclos de control como en los de tratamiento. El número de ovulaciones por yegua no fue significativamente diferente ($P > 0,05$) entre eFSH y grupos EPE, pero ambos fueron mayores ($P < 0,05$) que la del ciclo de control. El número de embriones que se obtienen por ovulación fue similar ($P > 0.05$) para el control, eFSH y grupos EPE. La alta cantidad de LH presentado con EPE no afectó a la respuesta de superovulación de las yeguas. Los tratamientos de superovulación aumentaron la tasa de ovulación de las yeguas, pero no afectaron la tasa de recuperación de embriones por la ovulación (Rosas *et al.*, 1998).

1.1.7 Comparación de la eficiencia de EPE y eFSH en la promoción de la superovulación en yeguas mestizas.

Se comparó la eficiencia del extracto de hipófisis equina EPE y la hormona folículo estimulante equina eFSH en la promoción de la superovulación en seis yeguas mestizas. Las yeguas fueron divididas

aleatoriamente en tres grupos: Grupo 1 considerado el grupo control, grupo 2 se aplicó EPE 25 mg vía intramuscular (IM), dos veces al día, y el grupo 3 donde se aplicó eFSH 12,5 mg por vía IM, dos veces al día. Los resultados mostraron que EPE y eFSH fueron capaces de promover la superovulación en las yeguas; 3,4 usando EPE frente a 4,2 con la eFSH (ovulaciones/yegua) y mejoraron el número de embriones recuperados 1,0 usando EPE frente a 2,2 con eFSH (embriones/yegua), en comparación con el grupo de control (0,4 embriones/yegua). Aunque no se observaron diferencias estadísticas, la tasa de recuperación de embriones fue numéricamente mayor para las yeguas tratadas con eFSH en comparación con EPE (50% vs 30%, respectivamente, para eFSH y EPE) (Machado *et al.*, 2004)

1.1.8 Evaluación de tres protocolos de superovulación FSH equino en yeguas

La superovulación podría aumentar la recuperación de embriones para la transferencia inmediata o criopreservación. Los objetivos fueron evaluar el efecto del pretratamiento con progesterona y estradiol (P + E), su respuesta folicular a eFSH, comparar las dosis de agentes eFSH sobre el desarrollo folicular y la ovulación en yeguas. En el Experimento 1, 40 yeguas fueron asignadas a uno de cuatro grupos de tratamiento. El grupo 1 constaba de los controles no tratados. Grupo 2 se administró eFSH sin pretratamiento de P+E. En el grupo 3 las yeguas fueron administradas con P+E durante 10 días a partir de mediados de diestro seguido de terapia eFSH. Grupo 4, las yeguas fueron administradas con P+E durante

conservado y perfeccionando la ambladura de sus ancestros berberiscos y el paso portante o castellano de los viejos caballos castellanos, llegando al paso llano o paso peruano, que combina incomparablemente, avance, comodidad y elegancia (Arata, 2002).

Durante los 5 siglos transcurridos en tierras americanas, el caballo llegado al Perú esculpió su carácter racial a fuerza de repetir la misma función de manera permanente y sostenida en los campos, quebradas y desiertos del virreinato del Perú. En el uso y la costumbre el caballo definió su estructura y su andar. Fue el pueblo-criador el que como gran usufructuario y beneficiario de la función, encontró en nuestro caballo la excelencia de la dinámica de sus movimientos. Él descubrió y priorizó a las características funcionales de la raza apreciando y escogiendo a los mejores ejemplares durante sus viajes, en faenas de campo o en entradas a pueblos (Cabrera, 2011).

1.2.1 Importancia

El ministerio de comercio exterior y turismo declaró en el 2012, al caballo peruano de paso como "Producto bandera", por tratarse de un producto de reconocida calidad, preferido por el mercado externo y de notable desarrollo en su producción y gestión en Perú (MINCETUR, 2012).

El Instituto nacional de cultura (INC), declaró en 1992 al caballo peruano de paso como patrimonio cultural de la nación y en el 2003,

mediante Resolución Ministerial N° 0097-2003-AG se aprobó el Patrón del Caballo peruano de paso (MINAG, 2014).

Caballo Peruano es hoy un simbólico emisario y embajador de la cultura del Perú en el mundo (Cabrera, 2011).

1.3 Morfología y función del tracto reproductivo

El sistema reproductivo se compone de dos grupos de órganos: (1) aquellas estructuras que son intrínsecas al tracto reproductivo (ovarios y los órganos genitales tubulares) y (2) las estructuras que están aisladas físicamente del tracto reproductivo, pero que desempeñan un papel en la regulación de los eventos de la reproducción (por ejemplo, la glándula pineal, la retina, el hipotálamo, la glándula hipófisis) (Blanchard, 1998).

Los principales órganos de reproducción femeninos incluyen los ovarios (folículos, cuerpo lúteo y ovocitos), genitales tubulares internos (oviductos, el útero, el cuello uterino, y vagina) y externos (vulva y los labios), y las glándulas mamarias o ubres, que dependen funcionalmente, en parte, de las hormonas y las interacciones hormona-receptor, especialmente las hormonas neuroendocrinas producidas y secretadas por el hipotálamo y la glándula pituitaria (Samper, 2009).

Los órganos del aparato reproductor femenino (de la hembra), incluyen ovarios, oviductos, el útero, la vagina y los genitales externos. Los genitales internos (el primero de cuatro componentes) están sostenidos por el ligamento ancho. Este ligamento consta del mesovario,

que sostiene al ovario; el mesosápix que sostiene al oviducto; y el mesometrio, que sostiene al útero (Hafez, 2000).

1.4 Neuroendocrinología de la hembra

Los cambios a nivel del control reproductivo, se encuentran regulados por el sistema nervioso central y el sistema endocrino. El sistema endocrino y el sistema nervioso funcionan para iniciar, coordinar y regular las funciones del aparato reproductor. El sistema endocrino utiliza hormonas, conocidos como mensajeros, para regular los procesos corporales, que son sustancias que inhiben, estimulan o regulan la actividad funcional del órgano o tejido blanco (Hafez, 2000).

Comenzando con el sistema nervioso central, el diencefalo del cerebro anterior está compuesto de tres regiones o glándulas (hipotálamo, hipófisis o glándula de pituitaria y la epífisis o glándula pineal) que producen señales neurales y endocrinas para regular el desarrollo y mantenimiento de los eventos reproductivos (Samper, 2009).

Las células neuroendocrinas, situadas en el hipotálamo, poseen axones que terminan en la neurohipófisis y en la eminencia medial y que secretan diversas neurohormonas, como la oxitocina y las hormonas hipofisiotropas, encargadas de controlar la secreción de las hormonas de la adenohipófisis (Guyton, 2000)

1.5.2 Mecanismos neurales

La señal fisiológica que inicia la motivación sexual es la secreción de hormonas esteroides. Una vez liberadas en el torrente sanguíneo las hormonas se unen rápidamente a sitios receptores en el sistema nervioso central SNC. Cuando el animal es motivado sexualmente se inician eventos de comportamiento, estímulos sensoriales específicos o inespecíficos que actúan en los órganos sensoriales, a través de mecanismos innatos o adquiridos, que están integrados en el cerebro para producirse como respuesta a reacciones motoras apropiadas (Hafez, 2000).

1.6 Hormonas

Las hormonas pueden clasificarse según su estructura bioquímica o su forma de acción. La estructura bioquímica de las hormonas incluye glucoproteínas, polipéptidos, esteroides, ácidos grasos y aminas (Hafez, 2000).

- **Estructura de las hormonas:** Según su estructura química, las hormonas de la reproducción se dividen en cuatro grupos:
 - a) **Proteínas.** Hormonas polipeptídicas con un peso molecular de 300 a 70 000 daltons, por ejemplo, oxitocina, FSH y LH.
 - b) **Esteroides** Derivan del colesterol y tienen un peso molecular de 300 a 400 daltons, por ejemplo la testosterona.

c) **Ácidos grasos.** Derivan del ácido araquidónico y tienen un peso molecular de alrededor de 400 daltons.

d) **Aminas.** Derivan de tirosina o triptófano, por ejemplo la melatonina.

(Hafez, 2000).

Existen tres clases generales de hormonas: 1) *proteínas y polipéptidos*, como las hormonas secretadas por la adenohipófisis, la neurohipofisis, el páncreas y la glándula paratiroidea, además de otras muchas. 2) *esteroides*, secretados por la corteza suprarrenal, los ovarios (estrógenos y progesterona), los testículos (testosterona) y la placenta (estrógenos y progesterona) y 3) *derivados del aminoácido tirosina*, secretados por la glándula tiroidea y la médula suprarrenal. No se conoce ninguna hormona que sean polisacáridos o ácidos nucleicos. (Guyton, 2000).

- **Receptores hormonales:** Cada hormona tiene un efecto selectivo en uno o más órganos blanco. Este efecto se logra mediante dos mecanismos:

- Cada órgano blanco tiene un método específico para enlazar esa hormona que no se encuentra en otro tejido.
- Los órganos blanco tienen algunas vías metabólicas capaces de responder a las vías metabólicas-hormonales no compartidas por el tejido que no es el blanco.

- **Formas de comunicación intercelular:** En la actualidad se ha descubierto que ciertos mensajeros químicos que no pertenecen a ninguno de estos sistemas (ni SNC, ni endocrino): los factores de crecimiento, actúan en el control de la reproducción. Las células se comunican entre sí a través de mensajeros químicos como las aminas, los aminoácidos, esteroides y polipéptidos. Hay cuatro formas de comunicación intracelular:
 - a) **Comunicación neural**, en la que ciertos neurotransmisores se liberan en las uniones sinápticas de células nerviosas y actúan como neurotransmisores entre las hendiduras sinápticas estrechas.
 - b) **Comunicación endocrina**, en la cual las hormonas son transportadas por la circulación sanguínea, típica de la mayor parte de las hormonas.
 - c) **Comunicación paracrina**, en la cual los productos de las células se difunden a través del líquido extracelular para afectar células vecinas que se encuentran a cierta distancia, por ejemplo las prostaglandinas.
 - d) **Comunicación autocrina**, en la que las células secretan mensajeros químicos que se unen a receptores en la misma célula que secreto el mensajero (Hafez, 2000).

1.6.1 Hormonas primarias de la reproducción

1.6.1.1 Hormonas hipotalámicas liberadoras- inhibidoras

Las hormonas del hipotálamo que regulan la reproducción son la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH o LH-RH), ACTH y el factor inhibidor de la prolactina (*prolactin inhibiting factor* PIF) (Hafez, 2000).

a. Hormona gonadotropina coriónica – GnRH

La GnRH es un decapeptido (10 aminoácidos). Este es sintetizado y luego almacenado en el hipotálamo basal medio. La GnRH proporciona un enlace humoral entre los sistemas neural y endocrino. En respuesta a las señales neurales de GnRH hacia el sistema portal hipofisiario para la liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) de la hipófisis anterior (Hafez, 2000).

Como tal, la hormona GnRH juega un papel fundamental en los procesos reproductivos en animales machos y hembras. Se establece en la medicina veterinaria para la inducción de la ovulación en ovejas, vacas y caballos. (Hyland et al., 1993).

Cuando la duración del día es la apropiada, se induce al hipotálamo para que produzca GnRH. La producción de GnRH, al igual que de otras hormonas reproductoras se produce de forma tónica y pulsátil. La secreción tónica está relacionada con la secreción de niveles basales y continuos, mientras que la secreción pulsátil se superpone a la anterior como una serie de pulsos o episodios de niveles más altos. Ambos, los niveles de secreción tónica y la amplitud y la frecuencia de los

episodios pueden variar a lo largo del ciclo. Un incremento en la secreción tónica, la amplitud o la frecuencia de los episodios, causa un incremento en los niveles medios de hormonas. Un 80% de la secreción de GnRH pasa directamente a través de los vasos de un sistema porta, el porta hipotalámico-hipofisiario, para tener un efecto directo en la hipófisis anterior (adenohipofisis); el 20% restante regresa al sistema nervioso central y afecta al comportamiento del animal (etología). Como respuesta a la GnRH, la adenohipofisis produce las gonadotropinas FSH y LH, cuyos órganos diana son los ovarios (Morel, 2009).

1.6.1.2 Hormonas adenohipofisiarias

El lóbulo anterior de la hipófisis secreta tres hormonas gonadotropicas: FSH, LH y prolactina. La LH y la FSH son hormonas glucoproteínicas. Los gonadotropos en el lóbulo anterior de la hipófisis secretan ambas hormonas. Cada una de ellas consiste en dos subunidades diferentes llamadas subunidades alfa y beta. La subunidad alfa es común a la FSH y la LH en una especie determinada, mientras que la subunidad beta es diferente y otorga especificidad a cada gonadotropina. Las subunidades alfa y beta de cualquiera de estas hormonas no tienen actividad biológica por sí mismas. La GnRH y esteroides gonadales regulan la secreción de gonadotropinas. Adicionalmente algunos péptidos gonadales regulan la secreción de FSH (Hafez, 2000).

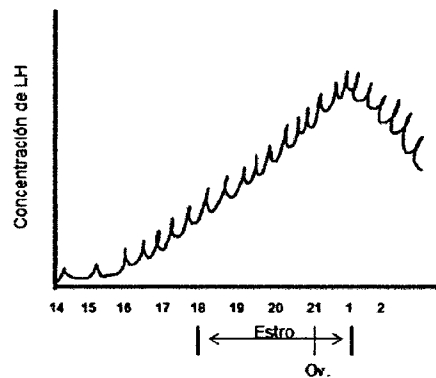


Figura 1.2 Variaciones en las concentraciones plasmáticas relativas de LH (Hormona luteinizante) en la yegua no preñada (Morel, 2009).

1.6.1.3 Hormonas neurohipofisarias

Las hormonas de la hipófisis posterior (neurohipófisis) difieren de las otras hormonas hipofisarias en que ellas no se originan en la hipófisis, sino que únicamente se almacenan ahí hasta que se necesitan. Las dos hormonas, oxitocina (hormona para la secreción de la leche) y vasopresina (hormona antidiurética o ADH), en realidad se producen en el hipotálamo. Estas hormonas son transferidas del hipotálamo a la hipófisis posterior, no a través del sistema vascular, sino a lo largo de los axones del sistema nervioso (Hafez, 2000).

a. Oxitocina

La oxitocina es sintetizada en el núcleo supraóptico del hipotálamo y es transportada por los axones de los nervios hipotalámico-hipofisario, en pequeñas vesículas rodeadas por una membrana. Las vesículas son almacenadas en las terminaciones nerviosas junto a los lechos capilares

en la neurohipófisis hasta que son liberadas a la circulación. La oxitocina también se produce en el cuerpo amarillo; por lo tanto, tiene dos lugares de origen, el ovario y el hipotálamo. La oxitocina ovárica está involucrada en la función lútea. Está actúa en el endometrio para inducir la liberación de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), que tiene una acción luteolítica (regresión del cuerpo amarillo) (Hafez, 2000).

La liberación de oxitocina parece estar implicada también en el mensaje de la ausencia de gestación. En este caso la oxitocina se produce en el cuerpo lúteo y se transporta por el torrente circulatorio hasta el útero, donde al parecer potencia la liberación de $PGF_{2\alpha}$ (Morel, 2009).

b. Melatonina

La melatonina se secreta por la glándula pineal en dos fases: fotofase (durante el día; y escotofase (durante la noche). Por lo tanto se trata de una secreción circadiana, donde los mayores niveles de secreción se evidencian durante la escotofase, la presencia o ausencia de luz del día se percibe por la glándula pineal mediante mensajes neurales a partir de la retina del ojo. No se conocen los mecanismos exactos por los cuales la melatonina controla el hipotálamo, pero parece probable que estén implicados la dopamina y opioides endógenos, incluyendo la β -endorfina (Morel, 2009).

La melatonina es sintetizada en la glándula pineal. Las células parenquimatosas de la glándula pineal captan el aminoácido triptófano de

la circulación y lo convierten en serotonina. Dos pasos del metabolismo de la serotonina están bajo control neural. El primero es la conversión de la serotonina en N-acetilserotonina, que es seguido por la conversión de N-acetilserotonina en melatonina. El segundo paso incluye la enzima formadora de melatonina, hidroxiindol-O-metil-transferasa (HIOMT).

La síntesis y secreción de melatonina se elevan mucho durante la oscuridad. La longitud de los días, asociada a una elevada secreción de melatonina quizá son responsables de la inhibición de los ciclos ováricos en la yegua (Hafez, 2000).

1.6.1.4 Hormonas esteroides gonadales

Los ovarios secretan primordialmente hormonas esteroides gonadales. También los órganos no gonadales, como las glándulas suprarrenales y la placenta, secretan hormonas esteroides en cierta medida. Estas son de cuatro tipos: andrógenos, estrógenos, progestinas y relaxina. Los tres primeros tipos son esteroides, mientras que el cuarto es una proteína. Los ovarios producen dos hormonas esteroides, estradiol y progesterona, y una hormona proteica, la relaxina.

Las vías biosintéticas en todos los órganos endocrinos que producen hormonas esteroides son similares; los órganos se diferencian solamente por los sistemas enzimáticos que contienen.

La vida media de los esteroides que se encuentran en el cuerpo de forma natural es muy corta. Por tanto, se ha sintetizado para uso clínico varios esteroides con una estructura bioquímica modificada. La actividad

secretoría de las hormonas esteroides por las gónadas está bajo control endocrino del lóbulo anterior de la hipófisis (Hafez, 2000).

a. Estrógenos

El estradiol es el estrógeno biológicamente activo producido por el ovario con pequeñas cantidades de estrona. Excepto por la posible secreción de pequeñas cantidades de estradiol en la fase lútea del ciclo, la mayor parte del estradiol y estrógenos urinarios relacionados son productos de la descomposición metabólica del estradiol/estrona secretados. Todos los estrógenos ováricos se producen a través de precursores androgénicos.

Los estrógenos circulan en la sangre ligados a proteínas de unión. De todos los esteroides, los estrógenos tienen el rango más amplio de funciones fisiológicas. Algunas de estas son:

- a) Actuar sobre el SNC para inducir el comportamiento estral en la hembra.
- b) Actuar en el útero para aumentar la amplitud y la frecuencia de las contracciones, potencializando los efectos de la oxitocina y la $\text{PGF}_{2\alpha}$.
- c) Desarrollar físicamente los caracteres sexuales secundarios femeninos.
- d) Ejercer el control de retroalimentación tanto positiva como negativa en la liberación de LH y FSH a través del hipotálamo. El efecto negativo se da en el centro tónico en el hipotálamo, y el positivo en el centro preovulatorio. (Hafez, 2000)

A medida que se desarrollan los folículos secretan estrógenos, siendo el estradiol 17- β el principal. Este estrógeno ovárico y esteroideo se produce a partir del colesterol por una interacción entre las células foliculares de la teca y las de la granulosa del folículo que se está desarrollando. Las células de la teca convierten el colesterol en progesterona, que difunde a las células de la granulosa vecinas, donde se transforma en estradiol 17- β . Esta conversión final en el seno de las células de la granulosa depende de la enzima aromatasa, cuya actividad es FSH dependiente. El estradiol se secreta al torrente sanguíneo y 24-48 horas antes de la ovulación alcanza un pico de 10-15 pg/ml, cayendo hasta niveles basales inmediatamente después del estro. Esta caída de estrógeno se asocia a la liberación de células de la granulosa dentro del fluido folicular como parte del proceso de ovulación, por lo que sólo quedan las células de la teca que siguen produciendo progesterona, pero al no existir células de la granulosa la progesterona no se puede convertir en estradiol 17- β . Los estrógenos son los responsables de los cambios de comportamiento en la yegua asociados con el estro y la receptividad sexual. A medida que se elevan los niveles de FSH, los niveles de estrógenos también se incrementan, y ambos alcanzan un pico durante el estro, asegurando que el máximo desarrollo folicular (preparándose para la ovulación), se sincroniza con el estro (Morel, 2009).

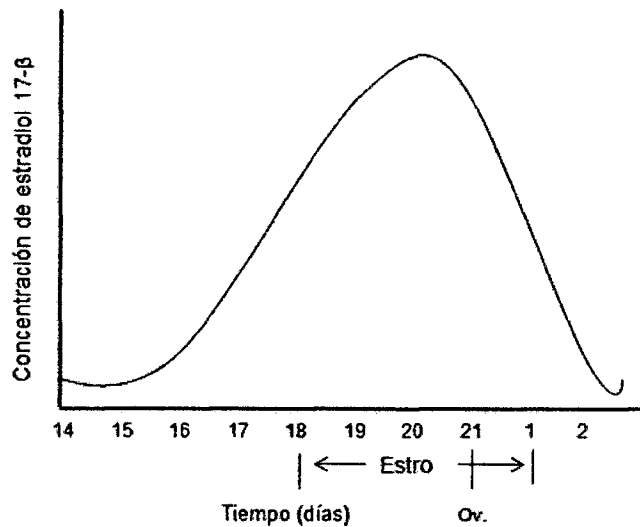


Figura 1.3 Concentración de estradiol

(Morel, 2009)

b. Progestágenos

La progesterona es el progestágeno natural más prevalente, y es secretada por células lúteas del cuerpo amarillo, la placenta y glándula suprarrenal. La progesterona es transportada en la sangre por una globulina de enlace, al igual que los andrógenos y estrógenos. La secreción de progesterona es estimulada por la LH principalmente.

La progesterona realiza las siguientes funciones:

- a) Actúa sinérgicamente con los estrógenos para inducir el comportamiento estral.
- b) En concentraciones altas, inhibe el estro y la oleada ovulatoria de LH. Así, la progesterona es importante en la regulación hormonal del ciclo estrual.
- c) Inhibe la movilidad uterina.

estimula la síntesis y liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$. La capacidad de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ para inducir luteolisis, ha sido aprovechada para manipular el ciclo estral e inducir el parto (Hafez, 2000).

Utilizando el metabolito de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (PGFM), de una vida media más larga, se ha observado que los niveles de $\text{PGF}_{2\alpha}$ se incrementan entre los días 14 y 17 después de la ovulación, inmediatamente antes de la caída que se observa de los niveles de progesterona. En las yeguas que padecen retención del cuerpo lúteo o aquellas que están preñadas, dicho pico de PGFM no se observa. Se sabe que el endometrio uterino secreta $\text{PGF}_{2\alpha}$ que es luteolítica (causa la destrucción del cuerpo lúteo), por lo que es la causante de la caída de los niveles de progesterona al final del ciclo (Figura 1.4).

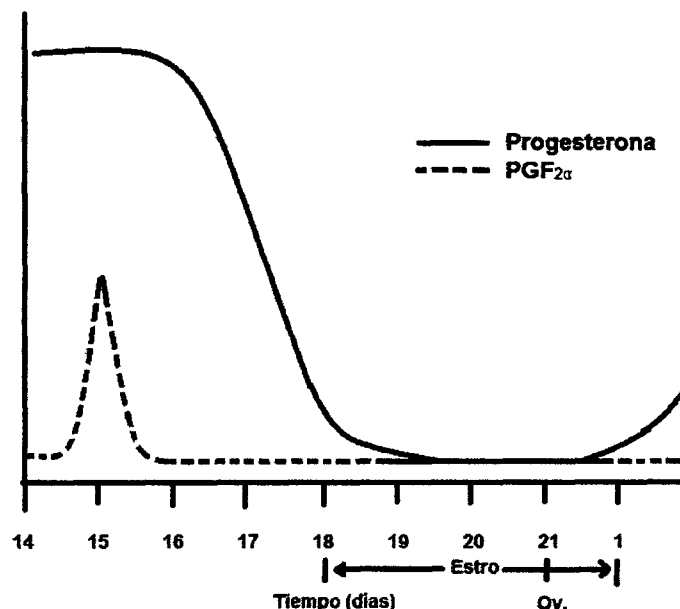


Figura 1.4 Variaciones en las concentraciones plasmáticas relativas de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y progesterona en la yegua no preñada (Morel, 2009).

En la yegua la $\text{PGF}_{2\alpha}$ alcanza el ovario a través de la circulación general, a diferencia de la vaca y la oveja donde el transporte se realiza por un sistema local de transporte contracorriente. La caída en los niveles de progesterona, en respuesta a la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ retira toda inhibición sobre la liberación de gonadotropinas, permitiendo que comiencen de nuevo los cambios hormonales asociados con el estro y la ovulación (Morel, 2009).

1.6.2 Hormonas sintéticas - Manejo hormonal

Debido a que el rendimiento reproductivo de las yeguas es menor que la de cualquiera de otras especies domesticadas, la terapia hormonal es importante para asegurar la fertilidad y el manejo adecuado de la preñez. (Squires *et al.*, 1987).

Debido a la amplia variación individual en la duración del estro y los intervalos interovulatorios en las yeguas, la inducción farmacológica es importante para la reproducción equina. Así desde 1970 la gonadotropina coriónica humana (hcg) ha demostrado consistentemente inducir ovulaciones y ha sido rutinariamente utilizada en el manejo reproductivo de la yegua. (Loy *et al.*, 1981).

1.6.2.1 Acetato de deslorelina

La deslorelina es un oligopéptido sintético análogo de la hormona liberadora de gonadotropina que se utiliza para fomentar la ovulación en yeguas con estros. El mecanismo de acción de la deslorelina es

equivalente al de la GnRH natural; estimula la liberación de la hormona estimulante de los folículos (FSH) y de la hormona luteinizante (LH) en la hipófisis. El aumento de la concentración de LH en la circulación fomenta la ovulación en yeguas con un folículo en desarrollo de diámetro superior a los 30 mm. El acetato de deslorelina es una droga sintética, por lo que tiene poca o ninguna variación entre lote y lote (Nagao *et al.*, 2012).

La deslorelina (Ovuplant, Fort Dodge Animal Health) fue aprobada para su uso en yeguas en Estados Unidos en 1999 en la forma de un implante subcutáneo de liberación controlada, administrado en yeguas con un folículo en el estro de 30 mm de diámetro, Ovuplant inducía la ovulación dentro de las 48 horas en más de 88% de yeguas ciclando regularmente. (Newcombe *et al.* 2002).

Después de la inducción de la ovulación con acetato de deslorelina (Ovuplant), las concentraciones de gonadotropina se reducen en el ciclo posterior, lo que lleva a un aumento de los intervalos interovulatorios en algunas yeguas (Farquhar *et al.*, 2010).

1.7 Fisiología reproductiva

1.7.1 Foliculogénesis

Durante el desarrollo fetal los oogonios se producen por multiplicación mitótica. Esto es seguido por la primera división meiótica para formar varios millones de oocitos, proceso que se detiene en la profase.

Al nacimiento una capa de células foliculares rodea los oocitos primarios en el ovario para formar los folículos primordiales. La forma y el tamaño varía con la especie, en la yegua tienen forma de frijol (o de riñón), debido a la presencia de una fosa de ovulación bien definida, y una indentación en el borde de unión del ovario (Hafez, 2000).

1.7.2 Ciclo estral

La yegua es poliéstrica estacional con fotoperíodo positivo. Es decir presenta varios ciclos estrales durante la temporada reproductiva, y se encuentra regulada por la cantidad de horas luz. El año calendario puede dividirse en cuatro etapas que difieren endócrina y fisiológicamente: etapa anovulatoria, transición de primavera, etapa reproductiva y transición de otoño.

- Etapa anovulatoria:

La liberación de melatonina es bloqueada por el estímulo producido por la luz. Durante el invierno, la mayor cantidad de horas de oscuridad, producen una cantidad suficiente de melatonina como para bloquear el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal. Como consecuencia, la GnRH es liberada en forma pulsátil con muy baja amplitud y frecuencia (pulsos débiles con intervalos muy largos entre cada liberación), resultando insuficiente para producir secreción de FSH y LH. A la palpación rectal, los ovarios se palpan chicos y duros por la ausencia de folículos antrales grandes (> 15 mm). La activación inicial de folículos preantrales, como se explicó anteriormente puede continuar ya que este es un proceso

gonadotrófico independiente. Se prefiere denominar a esta etapa anovulatoria y no anestro ya que algunas yeguas presentan signos de celo debido a la ausencia de progesterona y la liberación de estradiol desde las glándulas adrenales. La FSH durante el invierno se libera con una frecuencia de un pulso cada dos días siendo insuficiente como para producir el crecimiento de folículos mayores a 15 mm (Cintora, 2007).

- **Transición de primavera:**

El inicio de la actividad reproductiva se produce paulatinamente y luego de pasar por un período de aproximadamente 2 meses de transición. 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. La deficiencia estacional que se observa en la liberación de LH resulta en una concentración baja de los factores presentes en el líquido folicular como IGF-I, estradiol, inhibinas y factores angiogénicos. Todo esto conduce a que no se produzca la ovulación. La concentración baja de estradiol e inhibinas a su vez, lleva a una mayor concentración de FSH porque no se produce el mecanismo de retroalimentación negativo. Al principio de la transición ocurren sólo ondas foliculares menores. Se denomina ondas foliculares menores al reclutamiento de un número determinado de folículos que crecen entre y regresan simultáneamente sin la formación de un folículo dominante. Al final de la transición, ocurren ondas foliculares mayores. Se produce el reclutamiento de un conjunto de folículos antrales que si bien

regresan todos, uno de ellos logra alcanzar mayor tamaño que los demás, más de 21 mm de diámetro. A la palpación los ovarios se palpan como «racimos de uvas» por la presencia de muchos folículos de tamaño similar entre ellos (20-30 mm). El comportamiento de la yegua en esta etapa se caracteriza por tener celos largos e irregulares. La elevación de la LH permite la primera ovulación dando por terminado la etapa de transición y el comienzo de la etapa reproductiva (Cintora, 2007).

- **Etapa reproductiva:**

El comienzo de la etapa reproductiva sucede cuando las horas luz son suficientes para suprimir el reflejo inhibitorio producido por la melatonina sobre la liberación de GnRH. Los primeros ciclos del año suelen ser irregulares, adquiriendo más regularidad en cuanto a duración, a medida que avanza la estación reproductiva. La liberación de GnRH es continua con pulsos adicionales cada dos horas en diestro y dos pulsos cada hora en estro. En la yegua puede ocurrir una o dos ondas foliculares mayores por ciclo estral ya que la concentración de FSH puede ser secretada siguiendo un patrón uni o bimodal. Cuando es secretada con un patrón bimodal presenta un aumento plasmático del día 3 al 5 y un segundo aumento entre los días 11 a 13 del ciclo. Más entrada la etapa reproductiva, la FSH puede tener un patrón de secreción unimodal, aumentando solamente una vez por ciclo. A diferencia de la transición, en la temporada reproductiva sólo ocurren ondas foliculares mayores, ya que siempre se produce un folículo dominante. Según el momento del ciclo en

que se producen las ondas foliculares, se subclasifican en onda mayor primaria y onda mayor secundaria. Se define como onda mayor primaria al grupo de folículos que darán origen a la ovulación estral. La ovulación ocurre 24-48 horas antes de que finalice el estro. La onda mayor secundaria es la activación y diferenciación de folículos terciarios cuyo folículo dominante adquiere su mayor tamaño durante el diestro. Comienza a observarse ecográficamente al final del estro del ciclo anterior. La onda mayor secundaria varía su incidencia según la raza y en general se observa con mayor frecuencia al comienzo de la etapa reproductiva anual, ya que como se explicó, la FSH no siempre tiene una modalidad de secreción bimodal (Cintora., 2007).

- Transición de otoño:

Aunque los cambios fisiológicos que ocurren en la transición de otoño no están tan definidos como en el resto de las etapas anuales, se puede afirmar que durante el otoño ocurren cambios paulatinos que van a terminar temporalmente con la activación de folículos antrales y el mecanismo de la ovulación. Se ha observado que la FSH vuelve a tener un patrón bimodal de secreción como al inicio de la temporada reproductiva con un pulso cada dos días. La concentración sérica de la LH disminuye más rápidamente luego de su aumento pre-ovulatorio y finalmente no logra alcanzar los niveles necesarios para desencadenar la ovulación (Cintora, 2007).

1.7.3 Luteólisis

La vena uterina principal y la arteria ovárica son los componentes proximal y distal de una vía arteriovenosa local que interviene en los efectos luteolítico y antiluteolítico.

La histerectomía anula el efecto luteolítico y causa la persistencia del cuerpo amarillo.

Los cambios en el riego sanguíneo del tejido ovárico en la etapa lútea pueden atribuirse a cambios en el flujo de sangre al cuerpo lúteo (CL), que recibe la mayor parte del aporte sanguíneo. El flujo sanguíneo al CL participa en la regulación de esta glándula y el control de la actividad de las gonadotropinas a nivel de las células luteínicas. (Hafez, 2000).

1.7.3.1 Cuerpo amarillo

El cuerpo amarillo se desarrolla después del colapso del folículo en la ovulación. En la pared folicular externa se forman pliegues macroscópicos y microscópicos que penetran en la cavidad central. Tales pliegues consisten en un núcleo central de tejido de estroma y grandes vasos sanguíneos que se distienden. Las células se desarrollan pocos días antes de la ovulación y experimentan regresión con rapidez; a las 24 horas de la ovulación todas las células de la teca restantes se encuentran en avanzado estado de degeneración. Tras la ovulación comienzan la hipertrofia y luteinización de las células de la granulosa (Hafez, 2000).

1.7.3.2 Desarrollo del cuerpo lúteo

El aumento de peso del cuerpo amarillo es rápido al principio. En general el período de crecimiento es ligeramente más largo que el ciclo estrual. El diámetro del cuerpo amarillo maduro es mayor que el de un folículo de Graaf maduro, excepto en la yegua en la que es menor (Hafez, 2000).

1.7.3.3 Regresión

Si no hay fecundación el cuerpo amarillo sufre regresión, lo cual permite que otros folículos ováricos grandes maduren. A medida que sus células se degeneran, el órgano completo disminuye de tamaño, adquiere color blanco o pardo pálido, y recibe el nombre de *corpus albicans*. Después de dos o tres ciclos queda apenas una cicatriz apenas visible de tejido conectivo (Hafez, 2000).

1.8 Inducción de ovulación múltiple

La superovulación es una herramienta importante para el uso rutinario en la transferencia de embriones equino (ET) con el fin de reducir los costos y aumentar la eficiencia de los programas ET (Alvarenga *Et al.* 2008).

Estudios recientes han demostrado que el tratamiento superovulatorio conduce a alteraciones en la maduración de los ovocitos y el transporte, especialmente en yeguas con una alta respuesta de ovario (Alvarenga *et al.* 2008).

Durante el estro el folículo dominante se convierte en un folículo preovulatorio y bajo el control de un medio hormonal bien definido pasa a ovular. El porcentaje de ovulaciones dobles en yeguas es bajo. El éxito de las tecnologías reproductivas avanzadas en la yegua se verá reforzada por la superovulación eficaz para proporcionar múltiples ovocitos y embriones, múltiples técnicas como la transferencia de embriones (TE), transferencia de gametos intratubárica (GIFT) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). La superovulación aumentaría las tasas de preñez en yeguas normales y subfértiles, así como cuando se utiliza semen de sementales con subfertilidad. Durante los últimos 35 años, muchos investigadores han utilizado varios regímenes de hormonas, tales como gonadotropina coriónica equina (eCG), hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la inmunización contra la inhibina, extractos de pituitaria equinos (EPE) y una preparación parcialmente purificada de la hormona estimulante del folículo equino (eFSH) para inducir la superovulación en yeguas ciclando, pero la tasa de éxito ha sido limitado o inconsistente (ROSER *et al.*, 2012).

Se ha informado del uso del extracto de hipófisis equina (EPE), para inducir la ovulación múltiple en yeguas, sin embargo, las tasas de ovulación son pobres en comparación con los obtenidos en otras especies (Alvarenga *et al.*, 2001).

Extracto de hipófisis equina (EPE) se ha informado que puede inducir mayor desarrollo folicular en yeguas, pero la respuesta es

incompatible e inferior a los resultados obtenidos en los rumiantes sometidos a protocolos estándar superovulatorios (Scoogin *et al.*, 2002).

La mayoría de los embriones equinos son recogidos de yeguas con ovulaciones individuales, debido a que no hay ningún producto disponible en el mercado para inducir la superovulación en equinos (Squires *et al.*, 2003).

Las yeguas se suelen considerar una especie monovular, pero la incidencia de múltiples ovulaciones ha oscilado entre el 4 y el 43% (Ginther *et al.*, 2001).

Una amplia variación en los informes considera la raza, edad, estado reproductivo, la genética, la nutrición y la temporada como los principales factores que pueden afectar a la incidencia de múltiples ovulaciones en yeguas. La incidencia de ovulaciones múltiples en los pura sangre variaron entre 15 y 30%, mientras que en ponis y razas de luz parecían ser menores (2-10%) (Ginther 1990).

Investigaciones de superovulación inducida en yeguas mediante el uso de extractos de pituitaria equinos, FSH y la inmunización contra la inhibina limitada se han obtenido resultados inconsistentes (Squires 2005). En la actualidad, las yeguas donantes en programas de transferencia de embriones comerciales no son superestimuladas debido a la falta de tratamientos disponibles comercialmente. (Hunt, *et al.*, 2005).

Una de las mayores limitantes en equinos, en comparación con otras especies domésticas, es la dificultad de inducir una respuesta superovulatoria efectiva, en términos de número de embriones

recuperados, con la consiguiente limitante en las posibilidades de obtener más de un embrión y el mayor costo operativo por cada intento. Desde comienzos de los años 80 se han ensayado experimentalmente protocolos superovulatorios con extractos crudos o purificados de hipófisis equinas, FSH equina purificada, FSH equina recombinante; Gonadotrofina Menopáusica Humana (hMG); GnRH natural y análogos, con resultados muy variables. En el Perú ya se están realizando ensayos, pero aún no hay ningún reporte publicado (Gonzales, 2009).

1.9 Transferencia de embriones equinos (TEE)

La técnica de transferencia de embriones en equinos es el procedimiento por el cual se recolecta uno o más embriones, 6 a 9 días post ovulación, a través de un lavaje uterino transcervical de una yegua donante inseminada o servida por monta natural y se transfiere de manera no quirúrgica al útero de otra yegua receptora sincronizada previamente y que se encuentra en un estadio de post ovulación similar al de la yegua donadora (Gonzales, 2009).

Según reportes científicos en 1974, simultáneamente y de manera independiente en Japón e Inglaterra fue donde se reportó preñez por transferencia de embriones (TE) en equinos. Desde entonces, y coincidentemente con el desarrollo de la ultrasonografía reproductiva, a partir de los primeros reportes a comienzos de 1980, las TE han crecido sostenidamente durante las últimas tres décadas, instalándose como una de las herramientas biotecnológicas de más alto impacto en sistemas de

producción de equinos de alta performance o valor genético (Gonzales, 2009).

En el Perú los primeros ensayos exitosos con transferencia embrionaria en equinos se realizaron durante el año 2003 en Virú, La libertad, siendo el ejemplar con registro genealógico YN-11756 la primera cría nacida en el Perú por TE. En la actualidad se encuentran operando en el país, por lo menos, 5 centros reproductivos de TE, sin contar con las transferencias embrionarias que se realizan de forma ambulatoria en diferentes criaderos en todo el país. Hoy en día, en el Perú, no solo se producen embriones de equinos, sino que también se congelan (Gonzales, 2009).

Podemos indicar que la transferencia embrionaria es una técnica de reproducción asistida que tiene el potencial de aumentar la eficiencia reproductiva de la especie, pero es conveniente y necesario remarcar sus limitaciones, dado su alto costo y que, algunas veces, las expectativas del criador exceden los resultados a obtenerse, generándole a estos frustraciones desagradables (Gonzales, 2009).

Los factores que afectan la eficiencia reproductiva de programas de transferencia de embriones equinos (EET) incluyen la edad, la selección y la gestión de los donantes y los receptores, el grado de sincronía, la calidad, la técnica de transferencia de embriones y las pérdidas de preñez (Squires, 2005).

Las limitaciones para un éxito comercial en la transferencia de embriones equinos EET incluyen consideraciones financieras en relación con los costos de adquisición, mantenimiento y destinatarios de sincronización, las restricciones de raza para el número de potros aceptados por temporada y subfertilidad de yeguas y sementales (McCue, 1996).

Algunas de las múltiples ventajas de la TE:

- Aumentar el número de potrillos por año en yeguas seleccionadas. En promedio, durante su vida reproductiva, una yegua de cría puede producir entre 5 y 7 crías de manera natural. Con la TE es posible multiplicar por 6 estos valores en programas de producción continuos.
- Permite la obtención de crías de yeguas en competición sin necesidad del stress de la preñez.
- Permite la obtención de crías en yeguas que no pueden gestar por problemas no reproductivos.
- Disminuye el intervalo generacional en la especie. Las hembras pueden dar embriones tan pronto como a partir de su primer celo.
- Elimina los riesgos de gestación y parto en yeguas de alto valor.
- Permite pruebas de progenie con mucho más eficiencia que con métodos naturales.

(Gonzales, 2009)

fueron aproximadamente la mitad de las correspondientes a yeguas jóvenes fértiles (71%). Además, las yeguas subfértiles producían una alta proporción de embriones anormales versus los producidos por las yeguas normales (Gonzales, 2009).

El día más temprano de recuperación del embrión es determinado por el tiempo en que éste demora en pasar desde el oviducto al útero. La mayoría de los embriones llegan al útero, generalmente, al día 5.5 post ovulación. Los intentos para recuperar los embriones en el día 6 resultan en tasas ligeramente más bajas comparadas con las del día 7, 8 ó 9. El día 8 ó 9 el embrión es de 1-2 mm de diámetro lo cual permite que éste, muchas veces, pueda ser visualizado a simple vista. Los embriones del día 10, son más difíciles de manejar y requieren de entrenamiento y materiales apropiados, de lo contrario resultará en menores tasas de éxito post transferencia (Gonzales, 2009).

Considerado todo esto, el día de preferencia de recuperación de embriones de acuerdo a nuestra experiencia, es el día 7.5, el día 8 es la segunda alternativa, pero también hay que considerar que en las yeguas muy mayores, es recomendable realizar el lavaje al día 9 ó 10 debido a que posiblemente su tiempo de tránsito tubárico sea mayor y la tasa de crecimiento del embrión, menor.

Las yeguas que se seleccionan como receptoras deberían ser jóvenes (3-10 años), estar en excelente estado de salud, condición corporal y aptitud reproductiva. Los embriones equinos pueden ser transferidos quirúrgica o no quirúrgicamente. Las transferencias no

quirúrgicas de embriones producen más altas tasas de preñez comparadas con las transferencias quirúrgicas y es el método más difundido en el mundo. En la técnica no quirúrgica transcervical, una pajuela de 0.25 ó 0.5 ml conteniendo el embrión y una pequeña cantidad de medio de transferencia es cargada en una pipeta de inseminación estéril y transferido a través de la cérvix (Gonzales, 2009).

El extremo de la pipeta es colocado dentro del cuerpo uterino donde es depositado el embrión. El uso de una vaina de plástico estéril como técnica protectora para cubrir la pipeta durante la transferencia mejoró las tasas de preñez. Es necesario tomar recaudos especiales respecto a la higiene del área perineal y en cuanto a la habilidad en la manipulación de la cérvix. La viabilidad de los embriones equinos en medio Holding puede ser de hasta 8 horas en condiciones controladas de laboratorio dependiendo de la calidad del embrión y las condiciones ambientales (Gonzales, 2009).

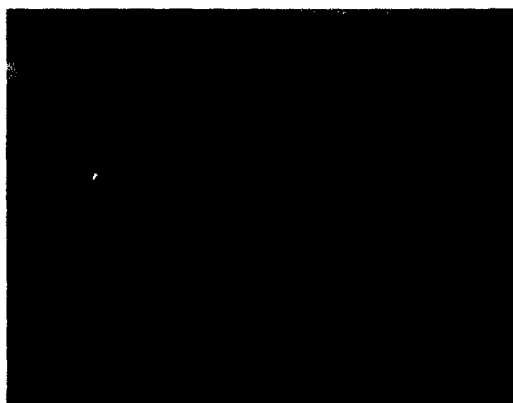


Imagen 1.6 Embrión anidado 7 días post transferencia.

(Gonzales, 2009).

Entre los factores más importantes que pueden condicionar los resultados de un programa de TE merecen destacarse:

- Fertilidad del semental
- Dificultad en la ovulación de las donantes
- Edad y condición reproductiva de la donante
- Correcta detección de la ovulación
- Condición reproductiva/nutricional/sanitaria y edad de la receptora
- Entrenamiento del operador
- Calidad del embrión
- Control de la sanidad durante todo el proceso. (Gonzales, 2009)

Bajo las condiciones ideales (donantes, receptoras, padrillos fértiles y personal capacitado), es posible obtener una tasa de recuperación de embriones de 50 a 80% y una tasa de preñez de 50 a 80%, lo que determinaría una tasa de eficiencia total del 25 al 65%. En yeguas subfértiles, tanto la tasa de recuperación de embriones como la de preñez post-transferencia son significativamente más bajas comparadas con yeguas normales (Gonzales, 2009).

La recuperación de embriones de yeguas de ovulación individual es de aproximadamente 50% por ciclo estral. La superovulación se podría utilizar para aumentar la recuperación de embriones y proporcionar embriones adicionales para la congelación de embriones. Esta revisión se refiere a algunos de los enfoques históricos de superovulación, que también examina los factores que afectan la respuesta de las yeguas de FSH equino, vacunas eCG, GnRH y la inhibina han tenido un éxito

limitado en la estimulación de la ovulación múltiple. Numerosos estudios han demostrado que la inyección de extracto de hipófisis equina (EPE) resultará en tres o cuatro ovulaciones por ciclo estral y dos embriones. A purificada, la preparación EPE estandarizada (eFSH) también da lugar a una respuesta similar a la EPE. Factores que influyen en la respuesta a la EPE y eFSH incluyen días del tratamiento inicial, el tamaño del folículo más grande en el tratamiento inicial y la frecuencia de la inyección. Los embriones de una sola ovulando, yeguas tratadas y yeguas eFSH tratados ofrecen tasas de embarazo similares a la transferencia no quirúrgica. Cinco a 7 días de tratamiento eFSH también se ha demostrado para acelerar la primera ovulación de la temporada de reproducción. Los posibles problemas después de las inyecciones eFSH incluyen folículos anovulatorios y sobreestimulación o luteinizado. Se necesitan estudios para evaluar más a fondo los criterios para el inicio del tratamiento y determinar la forma de aumentar la tasa de ovulación sin disminuir la recolección de los embriones por ovulación. (McCue, 1996).

1.10 Diagnóstico ecográfico

En 1980, la ecografía en tiempo real fue reportada por primera vez como un método de diagnóstico de utilidad en la disciplina de la reproducción equina. Dado que las aplicaciones de la ultrasonografía diagnóstica en reproducción equina se han expandido hasta el punto de que el ultrasonido se ha convertido en una herramienta fundamental,

sección transversal permanece en el centro de la pantalla del monitor. A medida que el transductor se mueve más allá de la punta del cuerno uterino, el ovario se escanea en su totalidad. El transductor se mueve lentamente de vuelta al cuerno uterino hasta la bifurcación, y el cuerno uterino y ovario opuesto se analizan de una manera similar. Después de escanear el ovario opuesto, el transductor se mueve lentamente hacia la bifurcación y se gira ligeramente con un movimiento hacia atrás y hacia adelante a través del cuerpo del útero y el cuello uterino, mientras se retira del recto. Este procedimiento de exploración sistemática asegura que todo el tracto reproductivo se examina dos veces, permitiendo la identificación precisa de la ubicación de las preñeces únicas o múltiples y las condiciones patológicas uterinas, y proporciona la confianza de que ningún embrión se pasó por alto durante el proceso de examen. (Brinsko *et al.*, 2011)



Figura 1.7 Examinador avanza el transductor de ultrasonidos a la bifurcación del útero (Brinsko *et al.*, 2011).



Figura 1.8 El examinador mueve el transductor de ultrasonidos a la punta del cuerno uterino y ovario (Brinsko *et al.*, 2011).

La ecografía de diagnóstico se utiliza en la yegua de cría para (1) Evaluación de la actividad ovárica, (2) la detección y evaluación de la preñez, y (3) el diagnóstico de cambios patológicos en el tracto reproductivo (Brinsko *et al.*, 2011).

1.10.2.1 Examinación de los ovarios

Los ovarios de la yegua se visualizan fácilmente con la ecografía transrectal. El estroma de tejido conectivo es ecogénico (blanco) de manera uniforme. Los folículos están llenos de líquido y, por lo tanto, representadas como imágenes anecoicas (negro) circulares o de forma irregular, en el monitor de ultrasonido (Figura 1.9). La apariencia ecográfica de un cuerpo lúteo es variable y va desde una imagen uniformemente hiperecoica (Figura 1.10) a una imagen heterogénea o moteada, en el que sólo una parte de la glándula contiene material ecogénico. Debido a la frontera distinta, muchos cuerpos lúteos se

pueden distinguir del estroma circundante durante toda su vida. (Brinsko *et al.*, 2011).



Figura 1.9 Imagen ecográfica transrectal de los ovarios de yegua que contienen folículos anecoicos (negro).



Figura 1.10 Imagen ecográfica de un ovario de yegua que contiene un cuerpo lúteo hiperecótico (CL).

1.10.2.2 Estimación de la etapa del ciclo estral por características de ovario

Debido a la facilidad con la que los folículos y cuerpos lúteos se pueden detectar con ultrasonografía transrectal, esta técnica se puede utilizar para aproximar la etapa del ciclo estral en yeguas. También se puede distinguir a las yeguas que presentan ciclicidad reproductiva de las

que están en anestro estacional o están en estro de transición. (Brinsko *et al.*, 2011).

La llegada de la ecografía en tiempo real de alta calidad ha permitido el estudio detallado de la dinámica folicular en yeguas durante todo el ciclo estral. (Brinsko *et al.*, 2011).

Las yeguas tienden a tener ya sea una o dos ondas foliculares durante el ciclo estral, con una onda folicular siendo el patrón más común. En cualquier caso, el folículo ovulatorio se vuelve identificable con el ultrasonido aproximadamente 10 a 12 días antes de la ovulación. Los folículos de diestro (es decir, los folículos grandes detectados, mientras que un cuerpo lúteo funcional está presente), a veces se vuelven muy grandes. (Brinsko *et al.*, 2011).

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1 Localización

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones de los criaderos de caballos peruanos de paso, Fundo "Moltalvan" y "FESA", ubicados en el distrito de Lurín, al sur de la ciudad de Lima, región Lima; a una altitud de 250 m.s.n.m. y a 12°16' latitud sur y 76° 52' longitud oeste. Con una temperatura promedio de 17.5 a 19° C y precipitación media anual que fluctúa entre los 100 a 541.8 ml. La humedad relativa con medias anuales que fluctúan entre 81 a 84%.

2.2 Duración

La presente investigación tuvo una duración de doce (12) meses, realizados entre los meses de julio del 2012 hasta julio del año 2013. De los cuales 6 meses se invirtieron en el entrenamiento previo, tiempo en el que se adquirieron los conocimientos prácticos necesarios respecto a la evaluación ecográfica e interpretación de imágenes, luego durante un

mes se desarrolló la etapa pre-experimental que consistió en la selección de los animales, la fase experimental duró tres meses, desde el mes de marzo a mayo, y el procesamiento de datos se realizó en dos meses.

2.3 Materiales

Material biológico

- Yeguas de raza peruano de paso

Materiales no biológicos

- Guantes obstétricos
- Gel lubricante
- Sogas , trabas y acial
- Agua destilada
- Tubos de ensayo

Equipos

- Ecógrafo
- Refrigeradora
- Manga de manejo

Hormonas

- Cloprostenol sódico (Lutaprost 250®, Agrovvet Market Perú)
- Acetato de deslorelina (Deslorelin acetate®, Specialized performance compounds USA)

Fármacos

- Electrolítico multivitamínico con aminoácidos (Aminoplex®, Agrovét Market Perú)

Materiales auxiliares

- Cámara fotográfica.
- Agujas hipodérmicas número 21.
- Jeringas hipodérmicas de 3 ml.
- Algodón.
- Alcohol medicinal de 96°.
- Papel toalla.
- Cuadernillo de apuntes.

2.4 Procedimiento

2.4.1 Selección

Se seleccionó 95 yeguas del criadero "FESA", y 12 yeguas del criadero "Montalvan", todas de raza peruano de paso, estos animales se evaluaron y seleccionaron considerando una edad mínima de 4 años y una máxima de 22, corroborados con su registro de nacimiento; que hayan tenido por lo menos un parto a la fecha de evaluación, con registro del último celo, con fichas sanitarias y de desparasitación actualizadas; adicionalmente se realizó una evaluación reproductiva a través de la evaluación con ultrasonografía, reconociendo el estado de las estructuras anatómicas de la yegua, para tener referencias respecto a su funcionalidad reproductiva.



Foto 2.1 Selección de animales



Foto 2.2 Evaluación reproductiva – palpación

2.4.2 Alimentación y sanidad

La dieta alimenticia de los animales que participaron en esta investigación estuvo basada en pastos cultivados (maíz forrajero -*Zea*

maíz-, raigrás italiano- *Lolium multiflorum*-), heno (de alfalfa o avena) y/o concentrado, que se proporcionaba en cada corral. La dotación de alimentos se realizaba dos veces al día 4.5-5.0 kg por vez, de manera que cada animal consumiese en promedio 8-9 Kg de alimento (en base a materia seca). El agua estaba a libre disposición, así el consumo era de acuerdo a las necesidades de cada animal, variando según el clima, el ejercicio, la etapa fisiológica, etc.

Es necesario mencionar que como parte del esquema sanitario en ambos criaderos se realizaban desparasitaciones y aplicaciones de suplementos vitamínicos de forma regular, de manera que al momento de iniciar la investigación no fueron necesarias estas actividades. Los requerimientos nutricionales estaban cubiertos, descartando así problemas y/o alteraciones del ciclo reproductivo por deficiencias nutricionales.



Foto 2.3 Yegua alimentándose con chala forrajera en su corral

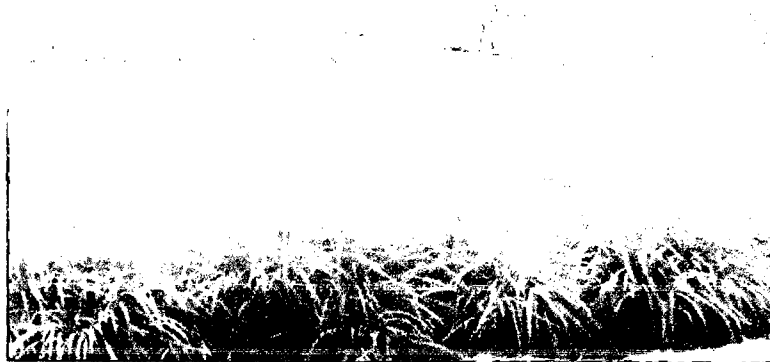


Foto 2.4 Pasto cultivado en el criadero



Foto 2.5 Pacas de heno destinadas a la alimentación de los equinos

2.4.3 Sincronización de celo

Con la intención de reiniciar el ciclo y evaluar un grupo de yeguas en el mismo período de tiempo, se usó Cloprostenol sódico (análogo de la $PGF_{2\alpha}$), cuya acción luteolítica sobre el cuerpo lúteo funcional permitía obtener un grupo homogéneo para el propósito de la investigación. La aplicación de esta hormona fue de acuerdo al siguiente esquema:

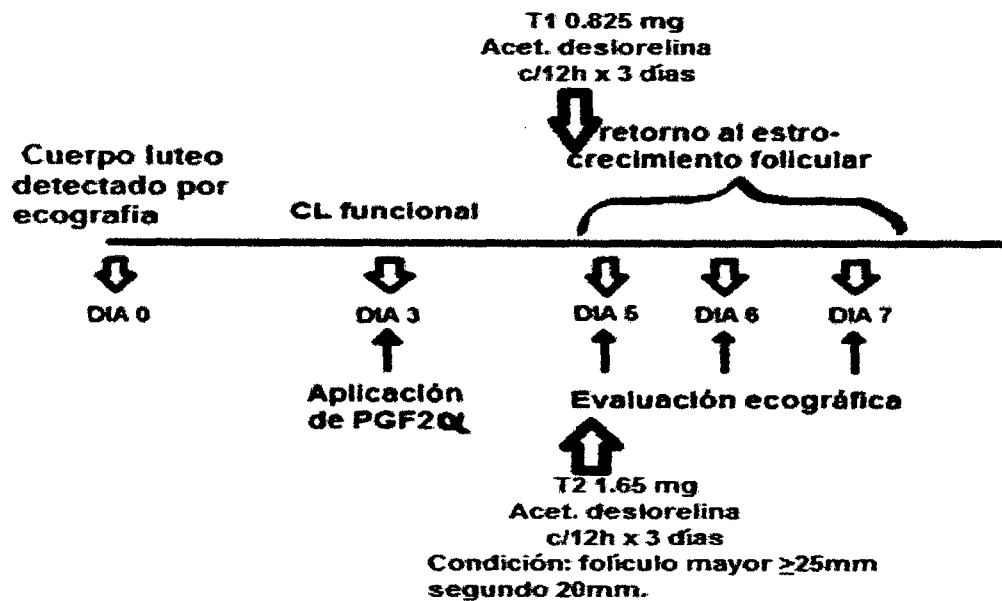


Figura 2.1 Sincronización del ciclo usando PGF_{2α}

2.4.4 Terapia hormonal

Basados en el protocolo propuesto por Alvarenga M., utilizando la hormona Acetato de deslorelina con una frecuencia y en concentraciones similares a las descritas por el autor planteamos los siguientes tratamientos:

Tratamiento 1: se utilizó 6 yeguas de raza peruano de paso, con edades entre los 4 y 15 años, con una mediana de 7.5 años; que tenían un peso entre 350 y 450 kg determinados de acuerdo a su condición corporal y estándar de raza. En este experimento tres días después de haber realizado una evaluación ecográfica que confirmaba la presencia de un cuerpo lúteo las yeguas recibieron 0.263 mg de Cloprostenol sódico (Lutaprost 250®, Agrovét Market Perú) por vía intramuscular (IM); a los tres días se inició el tratamiento con 0.825 mg de Acetato de deslorelina

(Deslorelin acetate®, Specialized performance compounds USA), que se diluyó en agua bidestilada y fue administrada cada 12 horas por inyección intramuscular (IM), durante tres días.

Tratamiento 2: en este experimento se usó 6 yeguas, con edades entre los 6 y 22 años; mediana de 8 años y un peso entre 350 y 450 kg. Tres días después de haber realizado una evaluación ecográfica que confirmaba la presencia de un cuerpo lúteo todas las yeguas recibieron 0.263 mg de Cloprostenol sódico (Lutaprost 250®, Agrovvet Market Perú) por vía intramuscular (IM). Cuando el folículo más grande en los ovarios tenía una medida ≥ 25 mm de diámetro y el segundo folículo fue de al menos 20 mm, se comenzó el tratamiento con Acetato de deslorelina (1.65 mg) diluida en agua bidestilada, administrada por vía intramuscular (IM) a intervalos de 12 horas, durante tres días.

Para ambos tratamientos se siguió el control ecográfico hasta la ovulación de todos aquellos folículos que hubiesen alcanzado tamaños preovulatorios (≥ 35 mm) durante el tiempo de evaluación, siendo que podrían ovular todos el mismo día o haber diferencias de 3-5 días, entre la ovulación del primero y último folículo.

Tratamiento 0 – grupo testigo: se seleccionaron 95 yeguas con edades entre los 4 y 16 años, y un peso entre los 350 y 450 Kg, quienes fueron evaluadas por ultrasonografía transrectal, luego de tres días de detectar cuerpo lúteo se aplicó Cloprostenol sódico (0.263 mg) por vía intramuscular, con la intención de reiniciar el ciclo, luego se monitoreo

ovario, determinando la presencia de folículos, cuerpos lúteos, cuerpos hemorrágicos, anovulatorios, etc.

- En caso de encontrar hallazgos de importancia en los ovarios, se congela la imagen para poder determinar la longitud y guardar la imagen.
- El camino de retorno hacia caudal se recorre nuevamente, para luego pasar hacia el lado derecho, en el que se realizará la misma operación, luego, a manera de retirar el transductor del conducto se van haciendo movimientos lentos de lado a lado, para recorrer nuevamente las estructuras. De esta manera estamos seguros de haber observado dos veces las estructuras de manera que tenemos mayor fiabilidad de los resultados.



Foto 2.8 Evaluación ecográfica de las yeguas en tratamiento hormonal.



Foto 2.9 Registro ecográfico de la evolución de los folículos.



Foto 2.10 Evaluación ecográfica de los ciclos estruales.

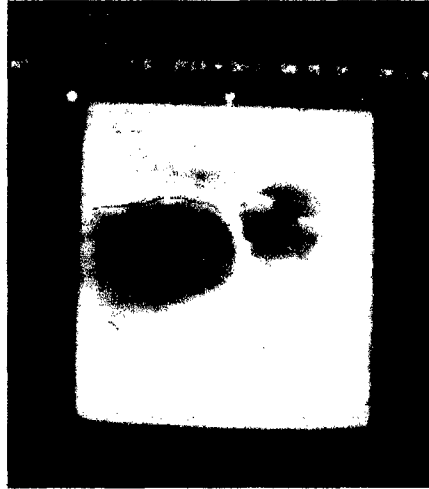


Foto 2.11 Imagen ecográfica de dos folículos de 27.5 mm (derecha) y 32.3 mm (izquierda), pertenecientes a la yegua Aspitiana del tratamiento 1 (T₁).

2.5 Análisis estadístico

Los datos recabados fueron sistematizados en hoja electrónica Excel y analizados a través de la estadística descriptiva básica (medidas de tendencia central y dispersión) para la determinación de las diferencias entre grupos usando la prueba T de Student cuya expresión es la siguiente:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\left(\frac{\sigma_1^2}{n_1}\right) + \left(\frac{\sigma_2^2}{n_2}\right)}}$$

DONDE:

\bar{x}_1, \bar{x}_2 = medias muestrales de los grupos comparativos evaluados

μ_1, μ_2 = medias poblacionales de donde se obtuvo las muestras

σ_1, σ_2 = varianzas muestrales de los grupos comparativos evaluados

n_1, n_2 = número de observaciones obtenidas de los grupos muestrales

Además para las variables relacionadas con proporciones se empleó la prueba estadística Chi cuadrado, a fin de establecer las diferencias entre grupos comparativos. Su expresión es la siguiente:

$$\chi^2_{(k-1, \alpha)} = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - e_i)^2}{e_i}$$

DONDE:

k-1 = grados de libertad de la variable estudiada

O_i = Valor observado en el i-esimo nivel de la variable

e_i = Valor esperado en el i-esimo nivel de la variable

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Frecuencia de folículos ovulados

El cuadro 3.1 presenta el número de folículos ovulados en cada tratamiento y del grupo testigo, encontrando mayor eficiencia en el tratamiento (T₂), donde hay mayor número de folículos ovulados siendo estos en un número de dos, tres y hasta cuatro con porcentajes del 33.33% para cada uno, es decir que 2 animales ovularon doble, dos ovularon 3 folículos y 2 ovularon cuatro folículos; en segundo lugar el tratamiento 1 (T₁) presentó un 16.67% de ovulaciones dobles, es decir 1 yegua presentó ovulación doble y 5 yeguas un 83.33% ovulaciones únicas. Mientras que el grupo control demostró que 83 yeguas, un 87.37%, presentaron ovulaciones únicas y 9 yeguas un 9.47% ovulaciones dobles de manera espontánea.

Cuadro 3.1 Frecuencias Porcentuales de la cantidad de folículos ovulados a nivel de los 03 grupos Estudiados

(Nro. folículos)	Frecuencia		
	T0	T1	T2
	(Testigo) (%)	(0.825 mg) (%)	(1.65 mg) (%)
0	3.16	0.00	0.00
1	87.37	83.33	0.00
2	9.47	16.67	33.33
3	0.00	0.00	33.33
4	0.00	0.00	33.33
n (yeguas)	95	6	6

Estos resultados son comparables a los presentados por Nagao *et al.*, (2012), quienes reportaron que el número de yeguas que tenían ovulaciones a partir de dos folículos por ciclo estral fue mayor en el grupo tratado con 100ug de acetato de deslorelina, iniciando el tratamiento ante la presencia de un folículo de tamaño ≥ 25 mm y un segundo folículo de 20mm (46 yeguas, 82%, en comparación con 0 en el grupo control). La diferencia en la respuesta a los tratamientos se puede atribuir a la variación en la concentración y frecuencia de uso del acetato de deslorelina, ya que Nagao *et al.*, (2012), administraron la hormona por un período de hasta 3.5 días, tiempo en el que los folículos alcanzaron medidas de 35mm–38 mm, además su protocolo incluía el uso de la

hormona hCG que administrada a yeguas con más de un folículo preovulatorio amplía la posibilidad de una doble ovulación.

Sin embargo nuestros resultados son inferiores a los presentados por Alvarenga *et al.*, (2001) quienes utilizando extracto de pituitaria equina (EPE) demostraron una mejora en el porcentaje de la ovulación, con un promedio de 4-7 ovulaciones por yegua, pero con tasas de recuperación de embriones pobre. Podemos atribuir estas diferencias a que la respuesta superovulatoria de yeguas cíclicas al extracto de pituitaria equina es dependiente de la población folicular al inicio del tratamiento debiendo este comenzar en el inicio de la onda folicular, antes de la aparición del folículo dominante.

3.2 Numero de ovulaciones

El cuadro 3.2 refiere el número promedio de ovulaciones por ciclo estral, siendo mayor para el tratamiento 2 (T2) y significativo desde el punto de vista estadístico ($p < 0.05$), en el que se alcanzan 3.00 ± 0.80 ovulaciones por ciclo, en contraste con un 1.17 ± 0.17 ovulaciones en el tratamiento1 (T1) y un 1.06 ± 0.12 en el grupo testigo.

Cuadro 3.2 Promedio de folículos ovulados a nivel de los 03 grupos estudiados

Variable	T0 (Testigo)	T1 (0.825 mg)	T2 (1.65 mg)
Nro. Folículos ovulados	1.06±0.12a	1.17±0.17a	3.00±0.80b

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$)

Nagao *et al.*, (2012), evaluaron 112 ciclos estrales, refiriendo 1.82 ovulaciones por ciclo, utilizando un protocolo semejante con acetato de deslorelina (100ug dos veces por día), los resultados reportados por Nagao *et al.*, (2012), hablan de ovulaciones dobles en un 82% de la muestra, las restantes fueron ovulaciones simples, mientras que en nuestro trabajo se presentan ovulaciones de hasta cuatro folículos en dos yeguas del tratamiento 2 T2, por lo que el promedio final es de 3.00 folículos ovulados por ciclo; entonces la heterogeneidad de las muestras debe ser considerada.

Adicionalmente podemos inferir que la diferencia se establece debido a factores de estacionalidad, ya que Nagao *et al.*, (2012), evaluaron yeguas de raza mangalarga marchador en condiciones de horas luz, temperatura, nutrición, etc., distintos; siendo que estos factores influyen directamente en el ciclo estrual de las yeguas.

Entonces el efecto del acetato de deslorelina como análogo de la hormona liberadora de gonadotropina GnRH, se pone de manifiesto en los trabajos analizados anteriormente ya que demuestra su efecto en la estimulación de crecimiento folicular.

También Alvarenga *et al.*, (2001) en un experimento usando extracto de pituitaria equina (EPE), reportaron 7.1 ± 5.1 ovulaciones, aplicando dos dosis diarias y 2.4 ± 1.8 una dosis por día. Aunque no está claro si el aumento de la tasa de ovulación se debe específicamente a la dosis o la frecuencia, la administración dos veces al día de una dosis alta de EPE mejora significativamente el desarrollo folicular y la ovulación.

3.3 Período de crecimiento folicular

El cuadro 3.3 muestra los resultados para el promedio de tiempo transcurrido desde el inicio del crecimiento folicular (20-25mm) hasta la ovulación (35-38mm), siendo el tratamiento 2 (T_2) con 6.22 ± 1.70 , el que muestra mejores resultados numéricos, respecto a los otros grupos evaluados, quienes tuvieron promedios de 7.29 ± 1.1 y 7.20 ± 2.03 para el tratamiento 1 (T_1) y tratamiento 0 (T_0), respectivamente; sin embargo, dicha diferencia no resulta significativa desde el punto de vista estadístico ($p < 0.05$).

Cuadro 3.3 Promedio del tiempo de crecimiento folicular hasta la ovulación a nivel de los 03 grupos estudiados

Variable	T0 (Testigo)	T1 (0.825 mg)	T2 (1.65 mg)
Período de Crecimiento Folicular (días)	7.20 ± 2.03a	7.29 ± 1.1a	6.22 ± 1.70a

Nota: Letras iguales indican que No existen diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$)

Raz *et al.*, (2009), compararon el efecto de la eFSH y acetato de deslorelina en la estimulación ovárica de yeguas donantes en la transición de primavera, resultando que desde el inicio del tratamiento hasta la ovulación transcurrieron 8.2 días y 7.2 días para eFSH y acetato de deslorelina respectivamente. Se plantea que difieren con nuestros resultados debido a la etapa de evaluación, dado que los ciclos que se desarrollan en etapas de transición, ya sea primavera u otoño, se caracterizan por su irregularidad, presentando diestros más largos y crecimientos foliculares que pueden terminan en anovulatorios o atresicos.

Nagao *et al.*, (2012) reportaron que las yeguas en el grupo control tuvieron un promedio de 6.7 días hasta la inducción de la ovulación, nuestro grupo testigo obtuvo 7.20 días; considerando que estas observaciones se refieren a los grupos control que no recibieron influencia

de terapia hormonal en su comportamiento, podemos atribuir estas diferencias a factores como la raza y la estacionalidad.

3.4 Período de ovulación

El cuadro 3.4 muestra los resultados para el tiempo que transcurrió desde que los folículos alcanzaron el tamaño pre-ovulatorio (35-38mm) hasta que sucedió la ovulación, así encontramos que el tratamiento 2 (T₂) reduce de forma significativa estos tiempos; es decir que el T₂ presenta ventaja comparativa frente al grupo testigo, el cual presenta un tiempo de 3.84 ± 1.65 ; esta diferencia puede deberse al efecto de la dosis del acetato de deslorelina por su acción como análogo de la GnRH.

Cuadro 3.4 Promedio del tiempo de ovulación a nivel de los 03 grupos estudiados

Variable	T0 (Testigo)	T1 (0.825 mg)	T2 (1.65 mg)
Período de ovulación (días)	$3.84 \pm 1.65a$	$3.29 \pm 0.76ab$	$2.67 \pm 1.08b$

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$)

Una única administración de 25 mg de extracto de pituitaria equina EPE, por vía endovenosa, con la presencia de un folículo de 35mm de diámetro, es capaz de inducir la ovulación en un 75% de yeguas, en un período de 24 a 48 horas (Duchamp *et al.*, 1987, Melo *et al.*, 2005), aunque concentraciones de 10 y 5 mg aplicadas por vía endovenosa, son

también eficientes, presentando un intervalo de aplicación/ovulación de 34.4 ± 6.72 y 37.54 ± 3.05 horas para 10 y 5 mg respectivamente (Medeiros *et al.*, 2005)

Así se debe mencionar que la diferencia en el tiempo de ovulación varía dependiendo del fármaco utilizado, con un promedio de 36 a 42 horas para acetato de deslorelina (Samper *et al.*, 2002), 36 a 48 horas con BioRelease deslorelina (Fleury *et al.*, 2003), sin embargo nuestros resultados difieren de estos parámetros debido a que el uso de estas hormonas se da al registrar tamaño pre ovulatorio, en nuestro trabajo se utilizó deslorelina solamente los tres primeros días.

3.5 Actividad ovárica según la ubicación del ovario

El cuadro 3.5 reporta la frecuencia, expresada en porcentaje, de presentación de ovulación en uno u otro lado del ovario; siendo el tratamiento 1 (T₁) el que presenta diferencia significativa entre el lado derecho con 57.14% de mayor presentación, versus el lado izquierdo que presenta un 42.86% de frecuencia.

Cuadro 3.5 Frecuencias de ovulación (%) según ubicación del ovario a nivel de los 03 grupos estudiados

Frecuencia (lado de ovulación)	T0 (Testigo)	T1 (0.825 mg)	T2 (1.65 mg)
Izquierda	48.08	42.86	50.0
Derecha	49.04	57.14	50.0
Ninguno	2.88	0.00	0.00

Hoyos *et al.*, (1991), encontraron en trabajos efectuados mediante exámenes ecográficos seriados durante el ciclo estral, en yeguas de diferentes regiones que los promedios de ovulación son en un 60% del ovario izquierdo y un 40% del ovario derecho. Esta diferencia podría atribuirse a diferencias raciales que determinan la predisposición anatómica y fisiológica.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, G. (1999). El caballo en la historia de España. España: Ediciones Universidad de León. 85-88
- Alvarenga, M., Carmo, M., Alvarenga, F. (2008). Superovulación en yeguas: límites y perspectivas., *Journal Science Theriogenology*. 1-4.
- Alvarenga, M., (2003) Superovulación en yeguas ciclando usando eFSH. *Journal Equine Veterinary Science*, 23.
- Alvarenga, M., Mccue, P., Bruemmer, J., et al. (2001). Respuesta a superovulación ovárica y producción de embriones en yeguas tratadas con extracto de hipófisis equina dos veces al día. *Journal Science Theriogenology*, 56.
- Arata M. (2002). Apuntes para la historia del caballo peruano. Revista del LVII concurso nacional oficial del caballo peruano de paso. Asoc. nacional de criadores y propietarios de caballos peruanos de paso ANCP CPP, 55.
- Blanchard, L., Varner, D., Schumacher, J., (1998). Reproductive physiology of the nongravid mare. *Manual of equine reproduction*. USA: Editorial Mosby.
- Brinsko, S., Blanchard. (2011). *Manual of equine reproduction*. 3th Edition. USA: Mosby Elsevier.
- Cabrera, G., (2011). El futuro de nuestra afición. Revista del LXVI concurso nacional oficial del caballo peruano de paso de la asociación nacional de criadores y propietarios de caballos peruanos de paso ANCP CPP, 120.

- Cintora, I. (2007) Anatomía y fisiología del aparato reproductor de la yegua [en línea]. Colombia: Engormix. Disponible en: [www.engormix.com/anatomia fisiología aparato reproductor](http://www.engormix.com/anatomia_fisiologia_aparato_reproductor)[12 de Julio del 2014]
- Dippert, K., Hofferer, E., Palmer, E., et al. (1992). Inicio de la superovulación en yeguas 5 ó 12 días después de la ovulación utilizando extracto de hipófisis equina, con o sin análogos de GnRH. *Theriogenology Science*,38.
- Duchamp, G., Bour, B., Combarnous, Y., et al. (1987). Alternativas de solución con HCG para la inducción de la ovulación en la yegua. *Journal Reprod Fertility*,150-153.
- Farquhar, V., Cue, M., Carnevale, T., Nett, E., et al. (2010). Terapia con Acetato de Deslorelina (Ovuplant) en yeguas ciclando: el efecto de la extracción del implante en la secreción de FSH y de la función ovárica. *Equine Veterinary Journal*, 56.
- Fleury, J., Fleury, P., Sousa, F., et al. (2003.) Preliminary evaluation of a BioRelease delivery system for the controlled release of deslorelin for advancing ovulation in the mare: effects of dose. *Revista brasileira reproducción Animal*, 66.
- Ginther, O., Beg, M., Bergfeldt, D., et al. (2001). Selección folicular en especies monoovulares. *Science Biology Reproduction medline*, 47.
- Ginther, O., Bergfeldt, D., (1990). Efecto del tratamiento con GnRH durante la temporada de anovulatorios en múltiples tasas de ovulación

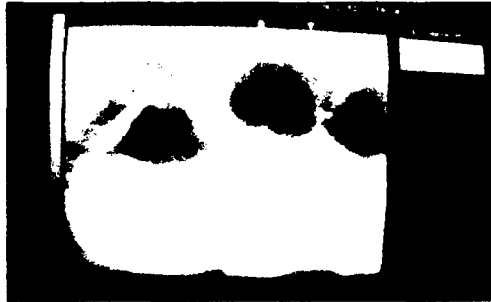
y en el desarrollo folicular durante la preñez en curso en yeguas. *Journal Reproduction Fertility*, 119-126.

- Gonzales, L., (2009). Transferencia embrionaria. Revista del LXIV concurso nacional oficial del caballo peruano de paso de la asociación nacional de criadores y propietarios de caballos peruanos de paso ANCP CPP, 99-106
- Guyton, H., (2000). Tratado de fisiología médica. 10^{ma} edición. México: editorial Mc Graw Hill. 150-160, 228-230.
- Hafez, E., (2000). Reproducción e inseminación artificial en animales. 4^{ta} edición. México: editorial Mc Graw-Hill interamericana. 199-220.
- Hoyos, A., Costa, A., (1991). Seguimiento del crecimiento folicular mediante ultrasonido [Tesis]. Caldas: Universidad de Caldas. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia.
- Hunt, C., Losinno, L., (2005). Double ovulations: frequency and impact on efficiency in a commercial embryo transfer programme. Meeting of the European Soc. of Embryo Transfer, 40-42.
- Hyland, J., (1993). Usos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y sus análogos para el avance de la temporada de cría de la yegua. *Science Animal Reproduction*, 33.
- Logan, N., Mccue, P., Alonso, M., et al. (2007). Evaluación de tres protocolos de superovulación FSH equino en yeguas. *Journal Animal Reproductive Science*, 48-55.

- Loy, R., Pemstein, R., O'canna, D., et al. (1996). Control of ovulation in cycling mares with ovarian steroids and prostaglandin. *Journal Theriogenology*, 15-17.
- Medeiros, A., Silva, J., Melo, C., et al. (2005). Utilização do extrato de pituitária equina como agente indutor da ovulação em éguas. *Acta Science Vet.*, 37-44.
- Melo, C., (2005) Inducción de ovulación en yeguas. Monografía [trabajo doctoral]. Botucatu: Universidad estadual Paulista. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, 24.
- Machado, M., Arantes, M., Peres, K., et al. (2003). Dinámica folicular, número de ovulaciones y embriones recuperados en yeguas sometidas a tratamiento superovulatorio, utilizando extracto de pituitaria equina y FSH equina purificada. *Revista Brasileira de Reproducción Animal*, 20-23.
- Ministerio de agricultura. (2000) [en línea]. Perú: el caballo peruano de paso; 2000. Disponible en: <http://www.minag.gob.pe/portal/sector-agrario/pecuaria/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-produccion/caballos-de-paso>[2014, 11 de agosto].
- Ministerio de comercio exterior y turismo. [en línea]. Producto bandera; 2012. Disponible en: <http://www.mincetur.gob.pe/newweb/>.[2014, 11 de agosto].
- Mccue, P., (1996) Superovulación en yeguas. *Equine Practice: Diagnostic Techniques and Assisted Reproductive Technology. Journal Veterinary Clinics of North America*, 27-30.

- Morel D., (2005). Fisiología de la reproducción de los equinos, cría y manejo de la yeguada. España: Editorial Acribia. 179-181,318-352.
- Nagao, J., Neves, J., Papa, F., et al. (2012). Inducción de doble ovulación en yeguas usando acetato de deslorelina. *Journal Science Theriogenology*, 80-83.
- Newcombe, J., Handler, J., Klug, E., et al. (2002). Tratamiento de yeguas en fase de transición con progesterona por vía intravaginal y con deslorelina o hCG para ayudar a ovulaciones. *Journal Equine Veterinary Science*, 22-57.
- Raz, T., Carley, S., Card, C., (2009). Comparación de los efectos de eFSH y regímenes de tratamiento con deslorelina en la estimulación ovárica y la producción de embriones de yeguas donantes en la transición de primavera temprana. *Theriogenology journal*, 71.
- Rosas, C., Alberio, R., Baranao J., et al. (1998). Evaluación de dos tratamientos de superovulación de las yeguas. *Journal theriogenology*, 49.
- Roser, F., Geraldine, M., (2012). Superovulación en la yegua: un trabajo en progreso. University of California - Department of Animal Science. (85):52-53.
- Samper, J., (2009). *Equine breeding management and artificial insemination*. 2^{da} ed. USA: Editorial Saunders Elsevier.
- Samper, J., Jensen, S., Sergenat, J., (2002). Timing of induction of ovulation in mares treated with ovuplant or chorulon. *Journal Equine Veterinary Science*, (80):45-47.

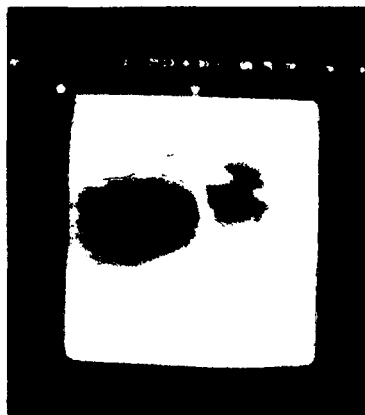
ANEXO 1



Fotografía 1 Imagen ecográfica de una yegua que muestra tres folículos; uno en el lado izquierdo y dos en el derecho.



Fotografía 2 Imágenes ecográficas de una yegua, que muestra un folículo de tamaño pre-ovulatorio.



Fotografía 3 Imagen ecográfica de una yegua que muestra dos folículos; en el mismo lado del ovario, uno dominante y otro secundario.



Fotografía 4 Imagen ecográfica de una yegua que muestra tres folículos; uno en el lado izquierdo y dos en el derecho.



Fotografía 5 Imagen ecográfica de una yegua que muestra un cuerpo lúteo en formación.

ANEXO 2

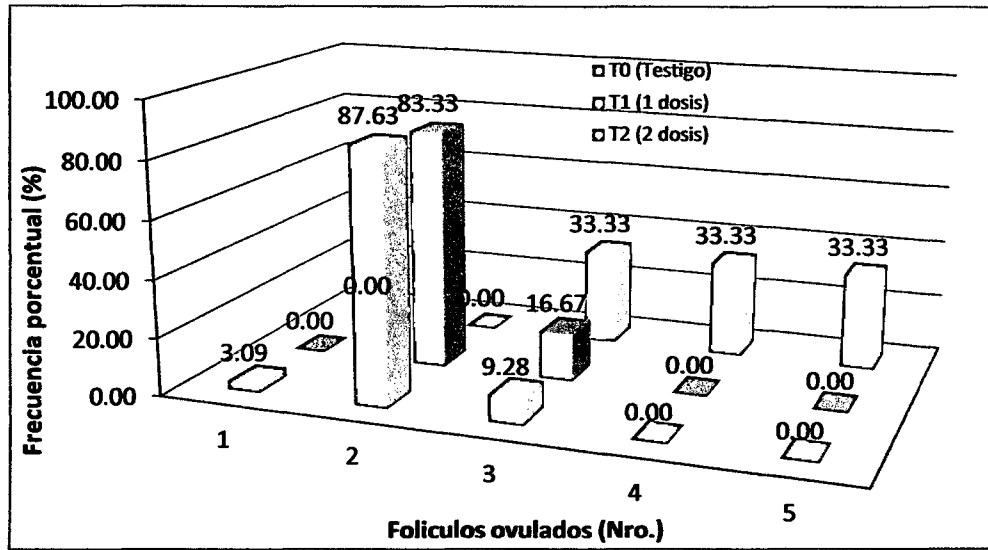


Gráfico 3.1 Frecuencias porcentuales de la cantidad de folículos ovulados a nivel de los 03 grupos estudiados

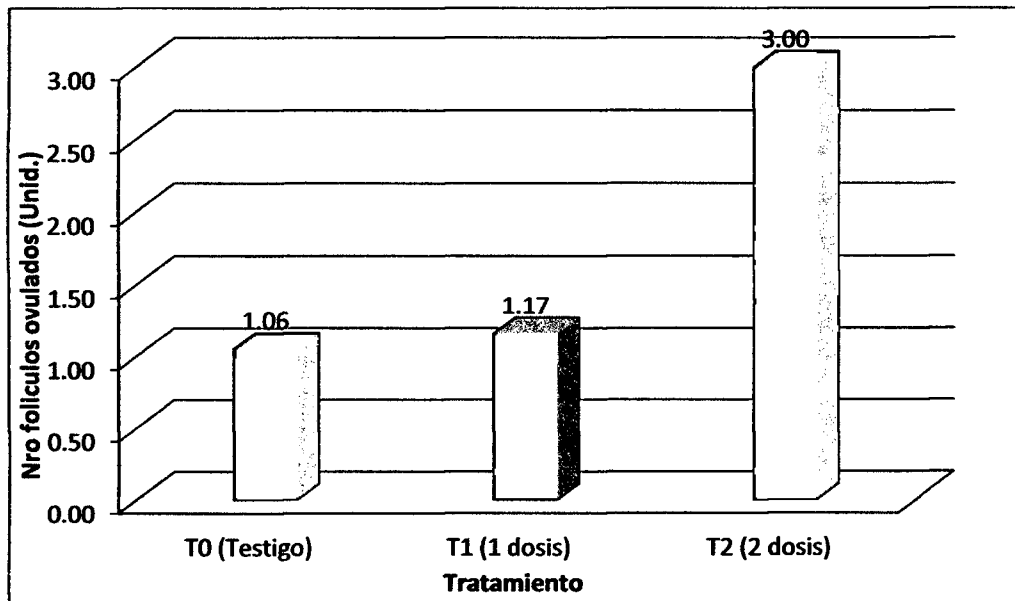


Gráfico 3.2 Promedio de la cantidad de folículos ovulados a nivel de los 03 grupos estudiados

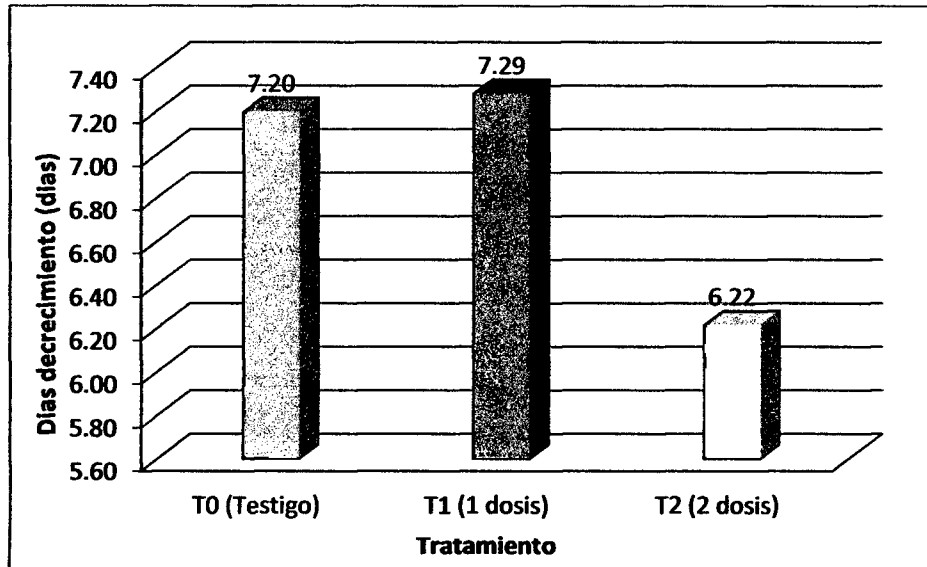


Gráfico 3.3 Promedio del tiempo de crecimiento folicular hasta la ovulación a nivel de los 03 grupos estudiados

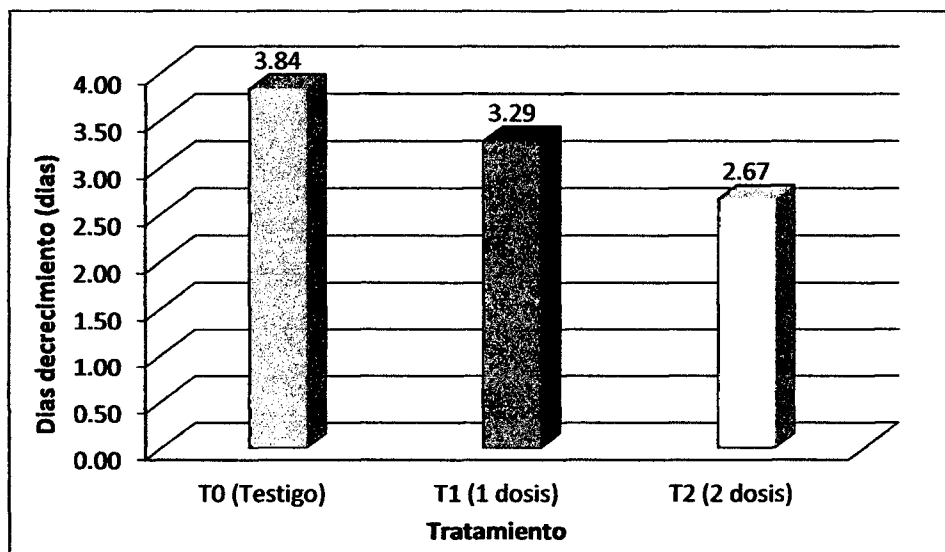


Gráfico 3.4 Promedio del tiempo de ovulación desde que alcanzaron tamaño pre ovulatorio hasta la ovulación a nivel de los 03 grupos estudiados