



# **UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

## **PROGRAMA DE DOCTORADO BIOCENCIAS Y CIENCIAS AGROALIMENTARIAS**

**“Contribución del Power Doppler para predecir la  
funcionalidad endocrina ovárica en yeguas Pura Raza  
Española”**

“Contribution of Power Doppler to predict ovarian  
endocrine functionality in Spanish Purebred mares”

Autora: María Joana Almeida Pires Marques de Campos

Directores: Prof. Dra. Estrella I. Agüera Buendía  
Prof. Dr. Francisco Requena Domenech

Tesis Doctoral

Córdoba, 2022

TITULO: *Contribución del Power Doppler para predecir la funcionalidad endocrina ovárica en yeguas Pura Raza Española*

AUTOR: *María Joana Marques De Campos*

---

© Edita: UCOPress. 2023  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>  
[ucopress@uco.es](mailto:ucopress@uco.es)

---



## **TESIS DOCTORAL**

### **“Contribución del Power Doppler para predecir la funcionalidad endocrina ovárica en yeguas Pura Raza Española”**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la licenciada en Veterinaria María Joana Almeida Pires Marques de Campos para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Córdoba.

VºBº Los Directores

Prof. Dra. Estrella I. Agüera Buendía      Prof. Dr. Francisco Requena Domenech

Córdoba a 19 de Diciembre de 2022

María Joana Almeida Pires Marques de Campos



**TÍTULO DE LA TESIS: “Contribución del Power Doppler para predecir la funcionalidad endocrina ovárica en yeguas Pura Raza Española”**

**DOCTORANDA:** María Joana Almeida Pires Marques de Campos

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

La presente Tesis Doctoral se ha realizado dentro del Programa de Doctorado de “*Biociencias y Ciencias Agroalimentarias*” de la Universidad de Córdoba. Cumple con los requisitos de la legislación vigente en cuanto a su relación con el programa de doctorado y originalidad. La metodología empleada es la adecuada y los resultados alcanzados relevantes desde la perspectiva científica.

La doctoranda María Joana Almeida Pires Marques de Campos ha realizado su actividad investigadora con un alto grado de implicación e interés, cumpliendo tanto con el Plan de Investigación como el de Formación (actividades obligatorias y opcionales) tal y como exige la actual normativa de los Estudios de Doctorado de la Universidad de Córdoba.

Como consecuencia de su trabajo se ha publicado el artículo titulado “*Assessment of age effects on ovarian hemodynamics using doppler ultrasound and progesterone concentrations incycling Spanish Purebred mares*” en la Revista Internacional *Animals*, indexada en Journal Citation Report (JCR) en Q1 en Veterinary Sciences con índice de impacto de 3.231 (2021).

Por ello, informamos, que debido a la calidad de la tesis y reuniendo los requerimientos científicos obligatorio para conseguir el Grado de Doctor por la Universidad de Córdoba se autoriza a la presentación y defensa.

Fdo. Prof. Dra. Estrella I. Agüera Buendía

Fdo. Prof. Dr. Francisco Requena Domenech



## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directores, la Profesora Dra. Estrella I. Agüera Buendía y el Profesor Dr. Francisco Requena Domenech, que sin ellos no hubiera sido doctora. Llevan años acompañándome incondicionalmente, ayudándome y dándome ánimo. Francisco es un ejemplo de veterinario, profesor y amigo. ¡Todo lo que se propone lo consigue, es un verdadero crack! Es sin duda una gran referencia para mí. Estrella es una mujer increíble que todo lo que hace lo hace bien, es un ejemplo para todas las mujeres. Tiene una fuerza capaz de levantar montañas, un cerebro privilegiado y una sensibilidad fuera de lo normal. ¡ Gracias, amigos!*

*A mi familia, en especial a mi madre que es un ejemplo de madre, profesora y mujer. Siempre supo orientarme y estimularme para que luchara por mis objetivos. Todos mis éxitos personales y profesionales me los debo a ella. Es una persona que solo piensa en los demás, ¡la más perfeccionista del mundo, inteligente y resolutiva...una líder! Y a mi hermano que siempre está disponible para atenderme y decirme algo bueno. Es el hermano que cualquiera desearía tener.*

*A mi padre, que por el soy veterinaria. He cumplido su sueño, nuestro sueño. Desde el cielo no para de mirarme y guiarme. Estoy segura de que estará muy orgulloso de mí.*

*A mi pequeña Madalena que nació en plena pandemia y que vino a alegrar y ocupar mi vida. Con ella aprendí el valor de una sonrisa y que no todo es trabajar en esta vida.*

*A Jesús, gracias por apoyarme en todo este tiempo y ayudarme en todos los momentos.*

*A todos mis amigos, compañeros y clientes por vuestra comprensión, reconocimiento y confianza.*



## ABREVIATURAS

**ACL:** área de cuerpo lúteo  
**CCC:** coeficiente de correlación de concordancia.  
**CL:** cuerpo lúteo  
**DFP:** diámetro del folículo preovulatorio  
**DS:** desviación estándar  
**E2:** estrógenos  
**ELISA:** ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas  
**FBCF:** factor básico de crecimiento de fibroblastos  
**FCEV:** factor de crecimiento endotelial vascular  
**FMVM:** flujo de mayor velocidad media  
**FSCL:** flujo sanguíneo del cuerpo lúteo  
**FSFP:** flujo sanguíneo del folículo preovulatorio  
**FSH:** hormona folículo estimulante  
**GnRH:** hormona liberadora de gonadotropina  
**hCG:** gonadotropina coriónica humana  
**IGF-I:** factor I de crecimiento similar a la insulina  
**IGF:** factor de crecimiento similar a la insulina  
**Kg:** kilogramo  
**LH:** hormona luteinizante  
**MHZ:** megahercios  
**mm:** milímetros  
**MSPE:** predicción de error cuadrático medio  
**ng/mL:** nanogramos/mililitro  
**NO:** óxido nítrico  
**P4:** progesterona  
**PGF2 $\alpha$ :** prostaglandina F-2-alfa  
**PI:** índice de pulsatilidad  
**PVD:** pico velocidad diastólica  
**PVS:** pico de velocidad sistólico  
**R<sup>2</sup>:** coeficiente de determinación  
**RI:** índice de resistencia  
**RMSPE:** raíz de error cuadrático medio,  
**%RMSPE:** raíz del cuadrado medio del error de predicción  
**2 D:** dos dimensiones

## ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN .....	9
2	OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	11
2.1	OBJETIVO GENERAL .....	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
2.3	HIPÓTESIS.....	11
3	ESTADO DEL ARTE.....	13
3.1	CICLO REPRODUCTIVO DE LA YEGUA .....	13
3.1.1	Biorritmo .....	13
3.1.2	Ritmo circadiano y reproducción equina .....	14
3.1.3	Ritmo circunannual y reproducción equina .....	16
3.1.4	Ciclo Estral.....	17
3.1.5	Mecanismos de control local.....	27
3.2	ULTRASONOGRAFÍA.....	29
3.2.1	Ultrasonografía convencional .....	29
3.2.2	Doppler pulsado. ....	30
3.2.3	Doppler color/power Doppler. ....	31
3.2.4	Doppler color como herramienta de exploración del aparato reproductor de la yegua.....	32
3.3	VALORACIÓN REPRODUCTIVA DE LA YEGUA: EXAMEN TRANSRECTAL.....	33
3.3.1	Evaluación óvarica .....	34
3.3.2	Evaluación uterina.....	37
3.3.3	Diagnóstico de gestación y viabilidad ovárica.....	38
4	MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
4.1	ANIMALES .....	39
4.2	MANEJO DE LAS YEGUAS .....	40
4.3	ULTRASONOGRAFIA.....	41

4.4	VALORACIÓN DE LA PROGESTERONA .....	42
4.5	ESTUDIO ESTADÍSTICO .....	42
5	<i>RESULTADOS</i> .....	45
5.1	Resultados del objetivo 1 .....	45
5.2	Resultados del objetivo 2. ....	47
5.3	Resultados del objetivo 3. ....	48
5.4	Imágenes ecográficas. ....	53
6	<i>DISCUSIÓN</i> .....	55
7	<i>CONCLUSIONES</i> .....	61
8	<i>RESUMEN</i> .....	63
9	<i>ABSTRACT</i> .....	67
10	<i>BIBIOGRAFÍA</i> .....	71
11	<i>ANEXO I. INDICIO DE CALIDAD</i> .....	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Fig. 1. Regulación del ritmo circadiano de la luz.....</i>	<i>14</i>
<i>Fig. 2. Resumen del ciclo estral de la yegua.....</i>	<i>29</i>
<i>Fig. 3 Evaluación ecográfica de una yegua en Yeguada Miguel Ángel de Cárdenas. ...</i>	<i>32</i>
<i>Fig. 4 Promedio y total de horas de sol registradas en la provincia de Sevilla en el año 2020.....</i>	<i>39</i>
<i>Fig. 5. Inseminación artificial a una de las yeguas del estudio.....</i>	<i>40</i>
<i>Fig. 6. Imágenes ecográficas de folículo anovulatorio y cuerpo lúteo.....</i>	<i>53</i>
<i>Fig. 7. El mismo cuerpo lúteo de una yegua joven .....</i>	<i>54</i>
<i>Fig. 8. Imágenes representativas de folículos ovulatorios. ....</i>	<i>54</i>
<i>Fig. 9. Cuerpo lúteos activos 5 días después de la ovulación. ....</i>	<i>54</i>

---

**ÍNDICE DE TABLAS**

<i>Tabla 1. Resume de las características principales de las diferentes fases del ciclo estral.</i> .....	18
<i>Tabla 2. Resumen de las posibles presentaciones del anestro. Adaptación de McKinnon et al., 2011</i> .....	26
<i>Tabla 3. Evaluación del grado de edema en yeguas. Adaptado de McKinnon et al., 2011)</i> .....	37
<i>Tabla 4. Estadísticos descriptivos (media ± desviación estándar (SD), mínimo (Min) y máximo (Max)) de los parámetros ultrasónicos del folículo y cuerpo lúteo y de la concentración plasmática de progesterona de las yeguas incluidas en esta investigación (n=30).</i> .....	45
<i>Tabla 5. Correlaciones bilaterales existentes entre los parámetros ecográficos teniendo en cuenta la edad (n=30). * p ≤0.05; ** p ≤0,01</i> .....	46
<i>Tabla 6. Medias de mínimos cuadrados de parámetros ultrasónicos y concentraciones de progesterona.</i> .....	47
<i>Tabla 7. Ecuaciones obtenidas de los modelos de regresión</i> .....	47
<i>Tabla 8. Estadísticos descriptivos del conjunto de las yeguas estudiadas en los días +6 y +14 post-ovulación</i> .....	48
<i>Tabla 9. Tasas de gestación por grupos de edad.</i> .....	48
<i>Tabla 10. Correlaciones bilaterales existentes entre los parámetros ecográficos teniendo en cuenta la edad (n=30). * p ≤0.05; ** p ≤0,01</i> .....	49
<i>Tabla 11. Estadísticos descriptivos de las yeguas jóvenes, evaluadas los días +6 y +14 post-ovulación (media ± desviación estándar (DS); mínimo y máximo) teniendo en cuenta su estado de gestación.</i> .....	50
<i>Tabla 12. .Media de mínimos cuadrados de los parámetros uterinos en el día +6 y +14 en yeguas jóvenes comparando los grupos de vacías vs preñadas</i> .....	50
<i>Tabla 13. Estadísticos descriptivos de las yeguas maduras, evaluadas los días +6 y +14 post-ovulación (media ± desviación estándar (DS); mínimo y máximo) teniendo en cuenta su estado de gestación.</i> .....	50
<i>Tabla 14. Media de mínimos cuadrados de los parámetros uterinos en el día +6 y +14 en yeguas maduras comparando los grupos vacías vs preñadas</i> .....	51
<i>Tabla 15. Tabla Estadísticos descriptivos (media ± desviación estándar (SD), mínimo (Min) y máximo (Max)) de los índices PI, RI y de la concentración plasmática de</i>	

<i>progesterona de yeguas vacías comparando yeguas jóvenes vs maduras</i> <i>(maduras vacías n=9; jóvenes vacías n=5) .....</i>	<i>51</i>
<i>Tabla 16. ....Media de mínimos cuadrados de los parámetros uterinos en el día +6 y</i> <i>+14 en yeguas vacías, comparando los grupos de jóvenes vs maduras. ....</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 17. Estadísticos descriptivos de yeguas preñadas jóvenes vs maduras (media ±</i> <i>desviación estándar (SD) de los índices PI, RI y de la concentración plasmática</i> <i>de progesterona de yeguas incluidas en esta investigación (maduras n=6;</i> <i>jóvenes n=10). ....</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 18. Media de mínimos cuadrados de los parámetros uterinos en el día +6 y +14</i> <i>en yeguas preñadas, comparando los grupos de jóvenes vs maduras .....</i>	<i>53</i>





# 1 INTRODUCCIÓN

El control reproductivo en las yeguas y la predicción de la funcionalidad ovárica son de suma importancia para el éxito de una ganadería equina. La yegua es un animal poliéstrico estacional en la que los procesos reproductivos se ven afectados por cambios estacionales en el fotoperiodo, siendo su ciclo de días largos, es decir en primavera-verano cuando ocurre el pico de la función ovárica. La ovulación de las yeguas se produce a intervalos de 21 días aproximadamente, durante la época reproductiva, 24 o 48 horas antes del final del estro. El final del estro, se ve reflejado en un aumento en los niveles de progesterona (P4), la cual es secretada por el cuerpo lúteo (CL) (García-Sacristán et al., 2018).

Con el uso de la ecografía convencional (modo B) se puede hacer un seguimiento folicular. Se mide el diámetro folicular y se evalúa la ecogenicidad de su interior y el edema uterino. En la mayoría de las yeguas sanas (sin ningún problema en el aparato reproductor), tras la evaluación uterina de la yegua, se puede inducir la ovulación con la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG); sin embargo, cada vez más nos podemos encontrar yeguas que no responden a la inducción de la ovulación (Brogan et al., 2016). Así mismo, en modo B, sólo podemos valorar el área y la ecogenicidad del CL, pero no su funcionalidad. En reproducción equina, es importante conocer con precisión el momento de la ovulación, para que el depósito del semen se realice lo más cerca posible del momento de la liberación del ovocito, así como la funcionalidad del cuerpo lúteo para evitar reabsorciones de la vesícula embrionaria por falta de secreción de P4.

La ultrasonografía Power Doppler es una técnica que ha demostrado tener un potencial añadido que permite mejorar las capacidades de diagnóstico (Squires et al., 1988; Ginther y Utt, 2004). Tiene la ventaja de ser un método no invasivo que permite evaluar no sólo las características morfoecogénicas, sino también los acontecimientos fisiológicos que ocurren durante el ciclo estral, como la vascularización y el flujo sanguíneo (arterial y venoso) de un órgano objetivo (Järvelä et al., 2002). La evaluación rápida de la función del CL mediante esta técnica ha sido validada en la yegua (Gastal et

al., 2006 a, b; Ginther 2007; Altermatt et al., 2012) y se ha establecido como un predictor fiable de la viabilidad del folículo.

La medición del folículo y del flujo sanguíneo del cuerpo lúteo (FSCL) se puede conseguir por mediante un manejo correcto de esta técnica y también después de la administración de tratamientos hormonales (Castro et al., 2016), lo que permite una comprensión más profunda de la fisiopatología reproductiva de una yegua. Para realizar un estudio en profundidad del ovario, una herramienta útil para evaluar la actividad del CL es la determinación de la concentración de P4 (Bollwein et al., 2016) . En consecuencia, la relación de la FSCL con la concentración de progesterona podrían ser un modelo predictivo para estimar la funcionalidad de la CL (Vecchio et al., 2012) evitando situaciones de estrés para los animales (Esposito et al., 2020), proporcionando un buen pronóstico y mejorando el cuidado de las yeguas y su gestión práctica (Robinson y Sprayberry 2009). La ultrasonografía Power Doppler podría contribuir a la mejora de la gestión reproductiva de los equinos, consiguiendo un mejor aprovechamiento del material genético y aumentando el rendimiento económico (Campos, 2017).

El Pura Raza Española es la raza equina autóctona más representativa que ha experimentado un gran auge en los últimos años y que está extendida por todo el mundo, por lo que es fundamental garantizar su preservación por parte del Estado español, como garante de un patrimonio genético que no puede sufrir ningún deterioro, evitando posibles riesgos de dispersión de criterios que puedan comprometer su adecuada conservación (Orden APA/3319/2002). Se considera yegua reproductora calificada aquella que tiene tres o más años de edad, que cumple con la aptitud básica para la reproducción, según los criterios establecidos referidos al prototipo racial o morfología, prueba funcional y examen del aparato reproductor y control veterinario (Orden APA/3319/2002).

Debido a que existe una falta de información sobre las posibles interrelaciones entre el flujo sanguíneo del folículo preovulatorio, el diámetro del cuerpo lúteo y la producción hormonal, este estudio es de gran ayuda e importancia para la industria equina a la hora de conocer el momento de la ovulación y viabilidad del gestación, seleccionando la época idónea para la cría, lo que ayudaría a mejorar el aprovechamiento del material de reproducción así como aumentar la rentabilidad de los procesos reproductivos en yegua de pura raza española.

## 2 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Utilizar la técnica ultrasonográfica power-doppler para la evaluación de la funcionalidad ovárica, así mismo como predictor temprano de gestación en la yegua Pura Raza Española para que pueda ser de aplicada en la práctica clínica de reproducción equina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

PRIMERO: Determinar mediante ultrasonografía modo B medidas morfométricas (diámetro-área) y mediante power-doppler el flujo hemodinámico de los folículos preovulatorios y de la funcionalidad del posterior cuerpo lúteo que formen en distintos grupos de edad.

SEGUNDO: Evaluar la influencia de la edad en parámetros ultrasonográficos (diámetro folicular, flujo sanguíneo folicular, área del cuerpo lúteo y flujo sanguíneo del cuerpo lúteo) y las concentraciones de progesterona.

TERCERO: Caracterización de la perfusión vascular uterina a través de los índices de pulsatibilidad y resistencia como predictores tempranos de gestación.

### 2.3 HIPÓTESIS

La hipótesis de partida es que las estructuras ováricas como folículos preovulatorios y cuerpos lúteos deben de tener una perfusión sanguínea adecuada para su fisiología endocrina al secretar hormonas. Si medimos con una técnica no invasiva como la ecografía doppler el riego sanguíneo de la mismas, aparte de su diámetros y áreas, y analizamos las hormonas en plasma mediante un ensayo por inmuno absorción ligado a

enzimas, conocido como ELISA, podremos establecer una ecuación de regresión que permita predecir la concentración hormonal únicamente con una ecografía ovárica.

Así mismo, la medición de los índices de pulsatibilidad y resistencia uterinos deben de variar tanto con la edad como con la gestación, y se podrían emplear como predictores tempranos de gestación.

### 3 ESTADO DEL ARTE

#### 3.1 CICLO REPRODUCTIVO DE LA YEGUA

##### 3.1.1 Biorritmo

Debido a la presión evolutiva se ha evidenciado que, al largo del tiempo, la mayoría de las especies que habitaban zonas que sufrían una gran diferencia de amplitudes térmicas han desarrollado mecanismos que les ha permitido adaptarse a los cambios ambientales vividos en el planeta Tierra a lo largo de los años. De este modo se han desarrollado sistemas de ciclos circadianos que utilizan los cambios en el fotoperiodo para ajustar la homeostasia de varios órganos. Así, los ritmos biológicos evolucionaron para proporcionar coordinación temporal en todos los tejidos y órganos, y permitir la sincronización de la fisiología con ciclos ambientales predecibles (Silverthorn, 2019).

Con respecto a los ritmos biológicos, los más importantes son los ritmos circadianos y circanuales, regulados principalmente a través de las señales fotoperiódicas de la retina. Comprender la naturaleza de los ritmos fisiológicos en las yeguas es de vital importancia para el manejo equino (Murphy, 2019). El sistema circadiano tiene tres componentes: (1) la entrada del estímulo desde el exterior, (2) un marcapasos dentro del sistema nervioso central o reloj central, y (3) salidas en forma de cambios en la expresión génica que influyen en la función fisiológica y comportamiento. Las salidas que se miden con mayor facilidad son los ritmos abiertos que se utilizan convenientemente también como marcadores indirectos del reloj interno. En los équidos, estos incluyen la temperatura corporal (Piccione et al., 2002 a; b), las concentraciones de hormonas (Murphy et al., 2007; Murphy et al., 2011), los ritmos de actividad (Piccione et al., 2005) y la expresión génica específica de tejido (Murphy et al., 2006; Martin et al., 2010; Watts et al., 2012) (Fig. 1).

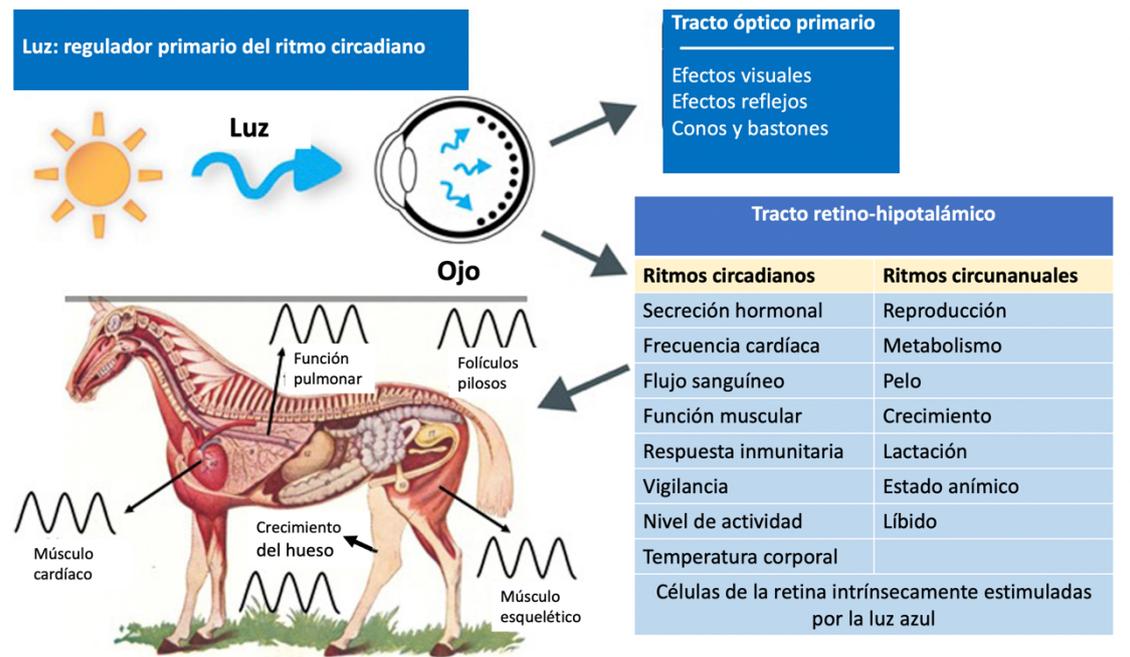


Fig. 1. Regulación del ritmo circadiano de la luz. Fuente: Murphy, 2019 (Modificado)

En las yeguas, el ritmo circadiano está regulado por los cambios registrados en el fotoperiodo. Esa señal ambiental es transformada en una señal endócrina en la glándula pineal, que secreta melatonina durante la fase de oscuridad. En esta especie, los días cortos y noches largas están relacionados con la disminución de secreción de gonadotrofinas y como resultado, hay una disminución de la actividad ovárica. (McKinnon, 2011).

Se considera que una de las salidas más estables del reloj circadiano es la producción nocturna de melatonina por la glándula pineal (Lewy y Sack, 1989), y su medición, junto con el cortisol (Klerman et al., 2002) y la temperatura corporal (Benloucif et al., 2005), se utiliza comúnmente como una medida de la salida del reloj interno y un marcador fisiológico de la fase circadiana en diferentes especies (Reppert et al., 1981; Ebling et al., 1988; Maywood et al., 1993). El ritmo de 24 horas en la melatonina sérica equina está descrito en la literatura científica (Guerin et al., 1995; Murphy et al., 2006; Murphy et al., 2007).

### 3.1.2 Ritmo circadiano y reproducción equina

Un reloj periférico en la glándula suprarrenal controla el ritmo circadiano de la producción de glucocorticoides que da lugar a la producción rítmica de hormonas

esteroideas (Son et al., 2008). En sementales salvajes en cautividad se han descrito fuertes ritmos de testosterona diarios (Kirkpatrick et al., 1976), con picos matutinos a las 8:00 a.m. y entre las 4:00 p.m. y las 12:00 a.m. Se ha demostrado que este perfil característico persiste durante las temporadas reproductivas y no reproductivas (Fernanda et al., 2012). Estos autores destacan que, para evaluar la fertilidad del semental, es fundamental considerar la hora del día en la que se toman las muestras para evitar errores a la interpretar los niveles séricos obtenidos.

Otro fenómeno reproductivo equino está relacionado con un control circadiano endógeno diurno. El momento de la ovulación en roedores se atribuye a la secreción de hormona luteinizante (LH) por la adenohipófisis, regulada a su vez por señales del sistema nervioso central (Yoshikawa et al., 2009), y los datos sugieren que un reloj circadiano impulsa la sensibilidad del ovario a la LH (Sellix et al., 2010). Algunos hallazgos en équidos sugieren que más de dos tercios de las yeguas ovulan durante la noche (Witherspoon y Talbot, 1970; Bowman, 2006). Se podría suponer que cuanto más intensas sean las señales de arrastre circadiano, más estrecha se volverá la ventana para la ovulación. De manera similar, los estudios en múltiples especies refieren que tanto la hora de inicio del trabajo de parto como el parto están relacionados con la hora del día. Se cree que esto ocurre a través de la liberación rítmica hipotalámica de oxitocina que influye en la actividad miometrial (Rozien et al., 2007).

Hay investigadores como Pashen y Allen, (1970) que no relacionan el inicio del parto con la hora del día, sino que opinan que en el potro, justo antes del parto y debido a las condiciones de hacinamiento en las que se encuentra, se activa el eje hipotalámico-adenohipofisario-adrenal, estimulando la liberación de cortisol fetal que desencadena una inversión de la relación progestágeno/estrógeno y sensibiliza el endometrio a la oxitocina (Fowen et al., 2008). Sin embargo, otros autores opinan que un pico nocturno en el ritmo endógeno de la liberación de oxitocina materna sea lo que decida la hora del parto, incluso si el aumento del estrés fetal decide pue ser que sea lo que el día. Esto lo respalda la evidencia del aumento de la actividad del miometrio uterino durante la noche en ponis prematuros tardíos (Haluska et al., 1987) y el hecho de que las yeguas paran predominantemente (86%) entre las 7:00 p.m. y las 7:00 a.m. (Rosalde y Short, 1967).

Desde una perspectiva del manejo equino también es importante la temperatura corporal de la yegua. El rango diario de temperatura varía en más 1°C con un pico al

amanecer y otro aproximadamente a las 10:00 p.m. (Piccione et al., 2002a). La variación de los valores entre la mañana y la noche, así como las diferencias de rango de temperatura individuales son cambios importantes a tener en cuenta en las evaluaciones diarias de la salud de animales. Concretamente, en los potros presentan variaciones de temperatura al amanecer que son detectables a partir de los 10 días de su nacimiento (Piccione et al., 2002b).

### 3.1.3 Ritmo circunannual y reproducción equina

Los ritmos circunuales endógenos permiten anticipar las estaciones e impulsar ciclos fisiológicos a largo plazo en mamíferos longevos que afectan a la reproducción, el crecimiento del pelaje, el metabolismo y la migración (Wood y Loudon, 2014; Ebling, 2015). La fotorrecepción en la retina registra el ciclo anual en duración del día y actúa como el sincronizador principal de estos ritmos. El fotoperiodo proporciona información estacional que permanece constante de año en año, sin embargo, no ocurre lo mismo con la temperatura, la disponibilidad de alimentos, la lluvia u otras señales mentales.

La señal del fotoperiodo es decodificada por cambios en la duración de la secreción nocturna de melatonina (Lincoln, 2006). Esta hormona puede actuar de dos formas: (a) ejerciendo su acción mediante un receptor o provocar una acción independiente del receptor. Dentro de las acciones mediadas por receptor está, entre otras cosas, el control de la reproducción estacional (Carrillo-Vico et al., 2006; Reiter et al. 2007). Fuera del sistema nervioso central, la mayoría de los receptores de melatonina se han observado en la pars tuberalis de la hipófisis (Morgan et al., 1996; Yoshimura, 2013), seguido de las arterias cerebrales, células de la granulosa de folículos preovulatorios, espermatozoides, entre otros (Dvorkin y Cardinali, 2005).

En los équidos, la melatonina funciona como un inhibidor de la reproducción. Esta hormona, afecta a la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), que, a su vez, controla la ciclicidad ovárica. La acción de la melatonina es indirecta e involucra una red de neuronas que transmiten la información desde las células diana en el hipotálamo premamilar a las neuronas liberadoras de GnRH en el área preóptica (Malpaux et al., 2001). Supresión de la secreción de melatonina, al alargar las horas de luz, aumenta su acción inhibidora en el eje reproductivo de la yegua y aumenta la frecuencia del pulso de frecuencia de la GnRH (Cleaver et al., 1991). Aunque el

fotoperiodo es el principal regulador de reproducción en équidos, fluctuaciones en la temperatura ambiente (Guerin y Wang, 1994), disponibilidad de alimento (Salazar-Ortiz et al., 2011) y proximidad del semental (Wespi et al., 2014) modulan este efecto hasta cierto punto.

En la naturaleza, la regulación anual de los ciclos reproductivos permite a los mamíferos reproductores estacionales restringir su actividad reproductora a la época del año que proporcionará las condiciones óptimas para la supervivencia de su descendencia (Malpaux et al., 2001). La temporada de actividad reproductiva varía con la especie y depende principalmente de la duración de la gestación, de forma que el parto ocurra durante temperaturas más cálidas, aumento del crecimiento del pasto y horas de luz más largas (Silver, 1990). Con una duración de gestación de entre 320 y 350 días, la actividad reproductiva en las yeguas se inicia acortando la duración de la producción de melatonina pineal en la primavera (Murphy, 2019).

Desde una perspectiva de manejo en una explotación, comprender las señales que impulsan las variaciones estacionales en la fisiología equina son importantes para la manipulación de la actividad reproductiva, desarrollo del ganado joven y rendimiento obtenido por la explotación (Murphy, 2019).

#### 3.1.4 Ciclo Estral

Después de la pubertad, la hembra entra en el periodo reproductivo cíclico que continuará a lo largo de la mayoría de su vida. El ciclo estral se categoriza de acuerdo con la frecuencia que ocurre durante el año. La yegua es un animal poliéstrico estacional que inician su actividad reproductiva, como se ha mencionado antes, durante los días largos, coincidiendo que inicia su ciclicidad con el incremento de las horas de luz/día. El ciclo estral se puede dividir en dos fases diferentes que se denominan en función de la estructura dominante presente en el ovario durante cada fase del ciclo. Esta división del ciclo estral son la fase folicular y la fase luteal. La fase folicular es el periodo desde la regresión del CL hasta la ovulación (proestro y estro) y la fase luteal que abarca desde la ovulación hasta la regresión del CL (metaestro y diestro). El anestro es una condición en la que la hembra no presenta ciclo estral (Reece, 2015).

Tabla 1. Resume de las características principales de las diferentes fases del ciclo estral.

FASE DEL CICLO		CARACTERÍSTICAS
<u>Fase folicular</u>	<i>Proestro</i>	Formación de folículos ovulatorios + secreción de estrógenos
	<i>Estro</i>	Receptividad sexual + pico de secreción de estrógenos
<u>Fase luteal</u>	<i>Metaestro</i>	Formación del cuerpo lúteo + comienzo de secreción de progesterona
	<i>Diestro</i>	Secreción luteal sostenida de progesterona
	<i>Anestro</i>	Ausencia de ciclo estral

#### 3.1.4.1 Proestro

El proestro comienza cuando disminuye la concentración de progesterona (P4) como resultado de la destrucción del CL (luteolisis) y termina con el comienzo del estro. Esta fase se caracteriza por una transición endocrina que va desde un periodo de dominancia de P4 hasta un periodo de dominancia de estrógenos (E2) secretados por los folículos maduros. Las gonadotropinas hipofisarias, LH y hormona folículo estimulante (FSH) son las responsables de esta transición. Durante el proestro el folículo antral madura para que se produzca la ovulación y el sistema reproductor femenino se prepara para el inicio del estro y el apareamiento (Senger, 2013).

#### 3.1.4.2 Estro

La especie equina es mayoritariamente monovulatoria, siendo poco frecuente la ovulación doble (7-25%). Durante la época reproductiva las yeguas ovulan con intervalos de aproximadamente 22 días, teniendo una duración de 5-7 días el periodo de estro (Aurich, 2011).

El comportamiento demostrado durante el estro es estimulado por el aumento de los niveles de E2, que puede ser sintetizado tanto por el folículo dominante en la ausencia de estructuras luteínicas activas como por la corteza de la glándula adrenal, e inhibido por la presencia de P4 (Aurich, 2011). La duración del estro está relacionada con el tamaño del folículo en el final de la fase de diestro, con la tasa de crecimiento del folículo dominante y con el tamaño final del folículo preovulatorio. De forma general, la ovulación ocurre entre las 24-48h que anteceden al final del estro. Un aumento de P4 proveniente del desarrollo del CL es responsable del fin del comportamiento de estro. Los comportamientos de estro no siempre indican que la yegua se encuentra en la fase folicular del ciclo estral. Se ha descrito científicamente que hembras en anestro estacional,

ovariectomizadas y preñadas presentan señales ocasionales de estro cuando son estimuladas por un semental (Asa et al., 1980; Asa et al., 1983). Las yeguas subordinadas jerárquicamente pueden inhibir las señales de estro en la presencia de una yegua dominante (Crowell-Davis, 2007). Según McKinnon et al., (2011). El comportamiento normal de una yegua en estro se caracteriza por las siguientes reacciones:

- Cola levantada, exponiendo la región perineal.
- Expresión facial caracterizada por la relajación de los músculos faciales.
- Eversión rítmica de los labios de la vulva y exposición del clítoris.
- Eliminar en pequeñas cantidades de orina de una forma pasiva
- Orejas relajadas y mantenidas hacia atrás en una posición neutral.
- Miembros posteriores en ligera abducción.
- Carpos y corvejones flexionados.
- Pelvis más baja.
- Vocalización.
- Comportamiento tranquilo, sin intentar morder o patear al semental.

De todas formas, actualmente, la mayoría de las yeguas no tienen un contacto frecuente con el macho. Es conocido que, aunque algunas hembras pueden tener preferencias por determinados machos, pueden rechazar a otros. Estos factores, entre otros, contribuyen para que algunas yeguas durante estro no demuestren los comportamientos característicos que serían de esperar en este periodo, cuando entra en contacto con el macho (Aurich, 2011).

#### 3.1.4.2.1 Dinámica folicular en la yegua

La foliculogénesis en las yeguas se caracteriza por una o dos olas foliculares (Ginther, 1992). Una ola folicular es el proceso de emergencia y crecimiento de varios folículos que inicialmente lo hacen de forma asincrónica, pudiéndose dar olas principales y olas menores.

. Los folículos que resultan de las olas principales pueden eventualmente disociarse o desviarse. Un crecimiento preferencial de uno, u ocasionalmente dos, miembros de la ola caracterizan esta desviación. Este folículo se denomina folículo dominante (Ginther, 1992). Este folículo seleccionado crece hasta un diámetro grande (> 28 mm) y luego puede retroceder (onda mayor anovulatoria) u ovular (onda ovulatoria). Los folículos restantes, denominados folículos subordinados, sufren atresia (Ginther et al., 2004a). En olas menores, el folículo más grande no llega a volverse dominante (Ginther et al., 2004; Pedrosa et al., 2011).

Una cascada de eventos bioquímicos intrafoliculares precede al comienzo de la desviación del diámetro folicular. El mecanismo que cambia esta cascada funcional implica concentraciones reducidas de FSH circulante y el logro de una etapa de desarrollo crítica por parte del folículo dominante futuro, que incluye la adquisición de receptores de LH de células de la granulosa y una mayor capacidad de respuesta a las gonadotropinas (Ginther et al., 2004; Ginther et al., 2008). El papel de la FSH, después del pico de aumento, implica el crecimiento y desarrollo continuo de todos los folículos antes de la desviación y el folículo dominante en desarrollo después de la desviación (Ginther et al., 2004a). Concomitante con el aumento de las dimensiones de los folículos, el estradiol continúa aumentando, alcanzando su concentración máxima alrededor de 1 a 2 días antes de la ovulación, cuando los folículos alcanzan su tamaño máximo (Donadeux y Pedersen, 2008).

En la mayoría de las especies domésticas la ovulación ocurre de 24 a 40 horas después de un pico de LH ovulatorio; sin embargo, en las yeguas la ovulación se observa cuando los niveles de LH aún están aumentando. Por lo tanto, el pico de LH ocurre alrededor de 48 horas después de la ovulación (Ginther et al., 2008). En el momento de la ovulación, el folículo preovulatorio crece hasta un diámetro máximo, alcanzando la fosa ovulatoria, volviéndose más suave y más sensible a la palpación a medida que se acerca la ovulación (Ginther, 1992). En la yeguas, todas las ovulaciones ocurren a través de la fosa de ovulación. El folículo ovulatorio se desarrolla, aumentando no solo en ancho sino también en profundidad a medida que se extienden a través del estroma ovárico e invaden la fosa de ovulación (Senger, 2013 ).

### 3.1.4.2.2 Predicción de la ovulación

Al séptimo día post el inicio del ciclo estral, se ha verificado el desarrollo de la onda folicular con la emergencia de un folículo dominante y se registra el aumento de la FSH. Al décimo tercer día ocurre la desviación folicular, momento en el que el folículo dominante (con 6 mm de diámetro) empieza a crecer una media de 3 mm al día, hasta un diámetro aproximado de 35mm. En ese momento la FSH empieza a disminuir y hay un aumento del estradiol-17 $\beta$  y de inhibina (suprime la secreción e FSH en la adenohipófisis para permitir el proceso de selección del folículo) (Senger, 2013).

Dos días antes de la ovulación, el diámetro folicular alcanza su meseta con unos 40 mm, se estanca su crecimiento y ocurre su maduración. Por último, alrededor del vigésimo primero día ocurre la ovulación, que origina la luteinización de las células de la granulosa. En este momento se registra el aumento de la LH, P4 y vascularización del área del futuro cuerpo lúteo CL (Ginther et al., 2008; Aurich, 2011). Los folículos preovulatorios pueden alcanzar un diámetro igual o superior a 55mm, lo que se evidencia de un modo sistemático en determinadas yeguas (Cuervo- Arango y Newcombe, 2008).

A menudo, el folículo dominante pasa de ser una estructura esférica para tener una forma más irregular antes del momento de la ovulación. Además, el folículo se vuelve más deformable entre las 12:00 horas antes de la ovulación. Durante la temporada reproductiva, el acercamiento de la ovulación se caracteriza por un adelgazamiento de la pared folicular, aumento de la ecogenicidad de las células de la granulosa y la aparición de una capa anecogénica alrededor del folículo. Estos cambios se deben al aumento de tamaño y número de células de la granulosa, aumento del flujo sanguíneo y edema de teca (Gastal et al., 1998).

Según McKinnon et al., 2011, los factores que se puede utilizar para prever la ovulación son: historia clínica de la yegua, tamaño y raza, tamaño del folículo, patrón de crecimiento folicular, número de días en estro, forma del folículo, tono folicular, espesor del borde folicular (determinado por ultrasonografía), disminución del edema uterino, administración de un agente inductor de la ovulación y época del año.

#### 3.1.4.2.3 Administración de hormona gonadotropina coriónica humana para inducir la ovulación

En reproducción equina, debido a que la inseminación artificial y la transferencia de embriones demandan que se conozca con exactitud el tiempo de ovulación, se utiliza de forma rutinaria la inducción a la ovulación. Entre los protocolos de manejo reproductivos, la hCG ha sido la primera hormona utilizada para estimular la ovulación (Cortés-Vidauri et al., 2018), siendo método que se utiliza de forma más frecuente en esta especie (Dolezel et al., 2012). Para que la inducción de la ovulación sea eficaz, el estro debe ser confirmado por la presencia de un folículo preovulatorio, con un diámetro igual o superior a 35 mm, y la presencia de edema uterino en grado 3 (Camilo et al., 2004; Samper, 2008). Se ha demostrado que la utilización de hCG induce eficazmente la ovulación dentro de las 36-48 h de su administración (Squires, 2008).

Según un estudio sobre el efecto de la hCG sobre la vascularización ovárica y folicular, se demostró que las yeguas a las que se les administró hCG (inductor de la ovulación) no mostraron cualquier aumento en el flujo sanguíneo en el folículo preovulatorio en comparación con las yeguas que ovulan naturalmente (Gastal et al., 2006c).

#### 3.1.4.3 *Metaestro*

En el metaestro fase posterior al estro, la capa de células epiteliales de la ruptura del folículo sufre una rápida hipertrofia e inicia la luteinización, formando el CL, las glándulas uterinas son activas, el músculo uterino relajado y el cérvix está constreñido, el moco vaginocervical es escaso y pegajoso, la mucosa vaginal es pálida (Arthur, 1975). Las células de la de la granulosa y la teca de folículo producen P4 en el metaestro y es detectable justo después de la ovulación (Senger, 2013).

#### 3.1.4.4 *Diestro*

El Diestro se caracteriza por ser el período de inactividad sexual entre dos períodos de estro. El primer período de diestro del año es un "evento de bienvenida" que ocurre después de una transición frustrante que la yegua tiene entre el anestro y el comienzo de sus ciclos estrales normales. Se describe como frustrante porque no hay forma de acelerar el inicio de los ciclos estrales normales una vez que ha comenzado la

transición. Esto se aplica incluso si la transición comienza antes de lo normal después de usar un tratamiento de incremento de la cantidad luz recibida por la yegua (Watson et al., 2002).

Por definición, una yegua en diestro tiene un CL funcional. El CL actúa como una glándula endocrina temporal formada por fibroblastos y restos de células de la granulosa del folículo recién ovulado. Esta estructura es responsable de la producción de P4 hasta el día 40 de gestación (Niswender et al., 2000). Entre el día 40 y el día 100 de gestación, la producción de P4 necesaria para el mantenimiento de la gestación es responsabilidad del CL secundario. Cuando no ocurre la gestación, el CL retrocede en respuesta a la liberación de PGF2 $\alpha$  del endometrio. Este fenómeno se registra 13-16 días después de que ocurra la ovulación (Weems et al., 2006).

La concentración sérica de P4 aumenta a aproximadamente 1-2 ng/mL poco después de que se produzca la ovulación, hasta una concentración máxima de 8-16 ng/mL cuando el CL está maduro. Aproximadamente 2 semanas después de la ovulación, la concentración de P4 comienza a disminuir y alcanza su concentración basal que se mantiene hasta el inicio de un nuevo estro, aproximadamente 15-16 días después de la ovulación (Ginther, 1992). Las hembras generalmente no son sexualmente receptivas durante el diestro. Sin embargo, según Ginther (1992), la interfaz entre diestro y estro no es en blanco y negro, sino en tonos de gris. Por ejemplo, las hembras con concentraciones bajas de progesterona sérica pueden ocasionalmente mostrar manifestaciones de celo (Ginther, 1992).

El examen de diagnóstico de gestación se realiza mediante ecografía en modo B. También se puede tomar una muestra de sangre para medir la concentración de progesterona si existen dudas sobre la detección de estructuras lúteas mediante ultrasonido. Si la concentración sérica de progesterona es mayor de 2-3 ng/mL, es indicativo de la presencia de un CL funcional (Ginther, 1992). Al comienzo de la temporada reproductiva (en primavera), la visualización ecográfica del edema uterino no es un indicador confiable de la proximidad del momento de la ovulación (Watson, 2002; Atayde y Rocha, 2011). Sin embargo, cuando se establece el ciclo estral (a lo largo de la temporada reproductiva), el edema uterino, representado por pliegues individuales en el endometrio, es una indicación útil para predecir el momento de la ovulación (Miró et 2004). Durante el estro, la alta concentración de estrógenos y la baja concentración de

progesterona contribuyen a aumentar la hinchazón de la pared uterina, la apertura del cuello uterino y la relajación del útero y la vagina. Por el contrario, durante la fase lútea, la pared del útero está ligeramente contraída y el cuello uterino firme y cerrado. La ecotextura uterina es homogénea y la presencia de edema es inexistente (Aurich, 2011).

#### 3.1.4.4.1 Uso de prostaglandinas durante el diestro

La prostaglandina  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ), en el aparato reproductor de la yegua, ejerce efectos sobre la ovulación (Weems, 2006), durante el paso del concepto por el oviducto (Freeman et al., 1992), en la producción de contracciones uterinas (Stout, 2011), en la inducción al parto (Jeffcott y Rossdale, 1977) o en la inducción al aborto (Baucus et al., 1987). No obstante, uno de sus efectos más investigados es su acción luteolítica que provoca el retroceso del CL y que da paso a un nuevo ciclo estral creciendo nuevos folículos (McCracken et al., 1972; Ginther, 1992).

En reproducción equina, en un intento de iniciar un nuevo ciclo estral de forma más rápida, se administra un análogo de  $PGF2\alpha$ , que provoca la lisis del CL maduro, permitiendo así que la yegua vuelva al celo en 3-4 días después del tratamiento, y para la ovulación en 8-10 días, disminuyendo así los días entre ovulaciones (Staempfli, 2011). Este tratamiento es eficaz cuando se aplica 5 días después de la ovulación. El comienzo de un nuevo ciclo estral y la ovulación ocurren aproximadamente a los 3-4 y 8-12 días, respectivamente, después de la administración de esta hormona. El intervalo entre ovulaciones depende del tamaño y el estado de los folículos en el momento de la medicación. Cuando coincide con la fase de crecimiento final del folículo preovulatorio, la ovulación puede ocurrir 48 h después de la inyección de  $PGF2\alpha$  (Cuervo-Arango et al., 2010).

Así, al intentar acortar el ciclo estral de la yegua, se debe administrar tratamiento con  $PGF2\alpha$  lo antes posible en la fase lútea, sin embargo, no está indicada su administración antes del 5º día posterior a la ovulación (ya que el CL aún no está maduro, como tal será refractario al tratamiento). La administración de prostaglandinas exógenas se usa comúnmente para acortar la duración del ciclo del estro y puede usarse con el objetivo de disminuir la probabilidad de endometritis después del apareamiento (Weems et al., 2006; Samper, 2005). Su administración en dosis únicas elevadas puede provocar luteolisis.

### 3.1.4.5 *Anestro*

El anestro es el periodo en el cual la yegua no se encuentra receptiva al semental, de un modo general, no es predecible que una yegua este en anestro a no ser que esta no demuestre ninguna señal de celo por lo menos en 21 días o durante todo el ciclo (Ginther, 1992). El crecimiento folicular es mínimo, solo algunos folículos registran un diámetro máximo de 16 mm, sin llegar nunca a ser un folículo dominante. La reducida concentración de LH en el torrente sanguíneo contribuye para el reducido crecimiento folicular. Sin embargo, debido a la presencia de FSH se pueden distinguir ondas foliculares durante la estación anovulatoria (Donadeu y Watson, 2007). Alternativamente, el anestro puede ocurrir en la presencia de un ciclo ovárico normal, con el desenvolvimiento folicular y ovulación. De este modo, el primer paso para el diagnóstico de la causa del anestro es una evaluación ginecológica en detalle y completa.

#### 3.1.4.5.1 *Anestro con actividad ovárica*

La ausencia del retorno al estro es la primera señal de gestación. Las yeguas gestantes presentan olas foliculares características durante los primeros meses de gestación y poseen, como mínimo, un CL activo. Después de la desaparición de todas las estructuras lúteas, alrededor del día 180 de gestación, los ovarios retroceden y se quedan inactivos, manteniéndose así hasta el momento del parto (Ginther, 1992).

La presencia de niveles elevados de P4 en el torrente sanguíneo, puede provenir de estructuras lúteas o de la unidad feto-placentaria, pudiendo ser suficiente para mantener la yegua como si estuviera en estado de diestro permanente. Por regla general, el CL se puede visualizar utilizando la ecografía transrectal del aparato reproductor, aunque puedan existir excepciones (Ginther, 1988). Concentraciones de P4 iguales o superiores a 1ng/mL suelen mantener la yegua en anestro y promueven la exhibición de señales típicas de anestro tales como: comportamiento agresivo delante del macho, patear, orejas extendidas hacia atrás, expresión facial de enfado (representada por tensión en los músculos faciales) y movimientos rápidos de la cola (Crowell-Davis, 2007). Bajo la influencia de una elevada cantidad de P4, el cérvix se presenta cerrado, firme y alargado, y el útero suele estar con un tono firme e la palpación y ausencia de edema (Ginther, 1992).

En el caso de que la concentración de P4 en el plasma sanguíneo esté elevada, y sabiendo que la yegua no se encuentra gestante, la administración de una dosis luteolítica de PGF2 $\alpha$ , promueve la lisis de las estructuras luteínicas presentes y la yegua debería entrar en estro en los 3-4 días siguientes (Staempfli, 2011). Un fallo en el inicio del estro en 5-6 días puede requerir la administración extra de PGF2 $\alpha$  y un fallo en esta respuesta confirma una fuente no luteínica productora de tan elevada concentración de P4.

### 3.1.4.5.2 Anestro sin actividad ovárica durante la estación reproductiva

Las principales causas de anestro durante la estación reproductiva son debido a la nutrición o lactación. Por un lado, en el anestro nutricional hay que tener en cuenta que, aunque después del parto las yeguas con baja condición corporal tardan más tiempo en quedarse gestantes y tienen periodos de anestro más largos, pueden volver al estro (Gentry et al., 2002). Las yeguas, una vez que se queden gestantes, pueden llevar la gestación a término sin ningún problema.

Por otro lado, en el anestro de lactación la gran mayoría de las yeguas tienen el “celo del potro” a los 9-10 días post parto. El anestro de lactación ocurre solamente en una media de 3-4% de yeguas paridas que presenten una buena condición corporal, sin embargo, puede ocurrir en más del 16% de las yeguas con una condición corporal baja (Heidler et al., 2004).

De este modo, las yeguas que presentan una baja condición corporal en el momento del parto tienen una mayor probabilidad de entrar en anestro de lactación. Además de estos dos factores, el anestro también podrá ocurrir debido a la introducción de implantes de GnRH, hipopituitarismo o por un factor idiopático.

Tabla 2. Resumen de las posibles presentaciones del anestro. Adaptación de McKinnon et al., 2011

ANESTRO		
Ovarios activos		Ovarios inactivos
<i>Con P4 alta constantemente</i>	<i>Sin P4 o P4 cíclica</i>	Anestro estacional
Gestación	Comportamental	Anestro nutricional/estacional
Retención de tejido luteínico	Insensibilidad estrógenica	Anestro de lactancia
Tejido luteínico ectópico o tumor		Anestro post ovulación
		Hipopituitarismo
		Administración GnRH
		Senescencia/Idiopático

### 3.1.5 Mecanismos de control local

Los rápidos cambios cíclicos en el crecimiento y la regresión del CL exigen que se dé la correspondiente rapidez cambios dentro de su vasculatura. Es bien sabido que la regulación de la angiogénesis es un factor crítico que regula la función lútea (Webb et al., 2002).

La angiogénesis consta de al menos tres pasos: (i) ruptura de la membrana basal de vasos sanguíneos existentes; (ii) migración de células endoteliales hacia un estímulo angiogénico y (iii) proliferación de células endoteliales para establecer un nuevo brote de vasos sanguíneos (Redmer et al., 2001). El factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV) es el principal factor angiogénico en el cuerpo lúteo (Reynolds y Redmer, 1998). En la yegua, las células lúteas expresan FCEV hasta la fase lútea tardía fase, cuando su expresión disminuye (Tamanini y Ambrogi, 2004). Es posible que este factor en el CL esté regulado por la LH (Dickson y Fraser, 2000).

En la yegua, la alta proliferación de células endoteliales en el CL temprano conduce a un aumento vascularización a medida que madura. La vasculatura densa que está presente en la fase lútea media es necesaria para que las células luteales liberen precursores de progesterona y progesterona (Al-zi'abi et al., 2002). La administración de PGF2 $\alpha$  parece reducir la expresión de FCEV inhibiendo proliferación de células endoteliales (AL-ziabi et al., 2003).

El FCEV también interviene en funciones no angiogénicas en el cuerpo lúteo, como regulación de la permeabilidad vascular, vasodilatación y mediación de la supervivencia de las células endoteliales después de la administración de PGF2 $\alpha$  (Folkman y Klagsbury, 1991; Goede et al., 1998; Berisha et al., 2000). Asimismo, puede desempeñar un papel indirecto en la migración de neutrófilos al CL en regresión estimulando la liberación de quimiocinas (Lee et al., 2002). El FCEV tiene un rol fundamental en la regulación de la angiogénesis y la luteólisis en el CL (Al-zi'abi et al., 2003) porque estimula el aumento de la permeabilidad vascular, la angiogénesis y la mitosis de las células endoteliales (Folkman y Klagsburn, 1991).

El primer factor angiogénico descrito en el ovario fue el factor básico de crecimiento de fibroblastos (FBCF) (Gospodarowicz et al., 1985). Este factor se expresa tanto en folículos maduros como en CL con pequeñas variaciones durante el ciclo ovárico. Su función es estimular la proliferación de células endoteliales (Bikfalvi et al., 1998) y ejercer un efecto antiapoptótico sobre las células de la granulosa, lo que favorece la producción de factores angiogénicos y la inhibición de la producción de óxido nítrico (NO) (Grasseli et al., 2002). Neuvians et al., (2004) describieron que el FBCF también puede estar implicado en la inducción de la luteólisis porque provoca la secreción de prostaglandinas en las células luteínicas de la especie bovina. El FBCF no desempeña una función crítica en la angiogénesis fisiológica durante la fase lútea porque se ha demostrado que su ausencia es compensada por otros factores (Tamanini y Ambrogio, 2004).

El NO, que se produce por las células endoteliales durante la fase lútea, actúa aumentando el flujo sanguíneo y como consecuencia estimula la relajación del músculo liso de las arteriolas. Por ello, favorece la angiogénesis ya que los perocitos capilares incrementan la producción del FCEV (Tamanini et al., 2003). Sin embargo, NO también puede tener un efecto luteolítico inhibiendo la progesterona y estimulando la secreción de prostaglandinas (Neuvians et al., 2004). En la yegua, el NO parece estar involucrado en el crecimiento folicular y la ovulación. Es posible que la inhibición de la actividad angiogénica en el CL equino por exposición a progestágenos a largo plazo también podría ser un proceso mediado por NO (Ferreira-Dias et al., 2006)

El factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) es una hormona polipeptídica una alta similitud de secuencia de la insulina segregada en múltiples tejidos por el efecto de la hormona de crecimiento. Tiene efectos endocrinos, autocrinos y paracrinos . El IGF también está regulada por interacciones con proteínas de unión de IGF, controlando su vida media y aclaramiento (Armstrong y Webb, 1997; Webb et al., 2002; Silverthorn, 2019).

El IGF es un promotor importante de la esteroidogénesis con el potencial de actuar en múltiples sitios. Asimismo, puede regular la angiogénesis y la apoptosis lútea. Se ha demostrado que la interacción del receptor de IGF con IGF-I protege una variedad de tipos de células, que incluyen células de ovario, de apoptosis. Modulan la función de las células lúteas mediante la interacción con receptores de superficie celular (Webb et al.,

2002). En la literatura científica se ha descrito que, en yeguas, una regresión o cese del folículo preovulatorio o una disminución de su diámetro 2 días antes de la ovulación está asociado a un descenso de la concentración IGF-I (Checura et al., 2010; Bashir et al., 2016). En el año 2011, Derar et al., demostraron que el receptor del IGF-I se secreta durante la fase estral del ciclo concomitante con el desarrollo del folículo dominante y que al mismo tiempo puede actuar en concordancia con otras hormonas para la selección y diferenciación del folículo dominante.

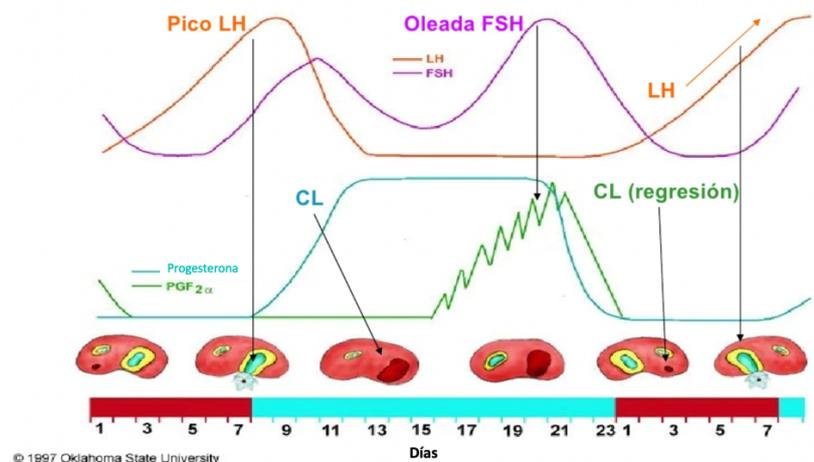


Fig. 2. Resumen del ciclo estral de la yegua. Fuente. Oklahoma State University, 1997.

## 3.2 ULTRASONOGRAFÍA

### 3.2.1 Ultrasonografía convencional

La ecografía transrectal en modo B se introdujo en la década de 1980, revolucionando la diagnóstico y seguimiento reproductivo en yeguas (Ginther, 2014). El modo B, permite representación de imágenes en una escala de grises en dos dimensiones (2D) de ecos, se utiliza no solo para identificar y medir estructuras, sino también para diagnosticar enfermedades. La ecografía en modo B produce una imagen que corresponde a una sección transversal del tejido dentro del plano escaneado. Esta sección transversal puede formarse en forma de una sola imagen congelada (estática B modo), o estar formado por la suma de numerosos fotogramas adquiridos que se mostrarán dentro de un segundo (modo B en tiempo real) (Reef, 1998).

Un método más nuevo en medicina veterinaria es el uso de la ecografía Doppler. Se trata de una herramienta no invasiva asociada al ultrasonido convencional modo B que es capaz de proporcionar información en tiempo real sobre aspectos hemodinámicos de los vasos sanguíneos de los órganos y su arquitectura vascular (Carvalho et al., 2008).

El examen reproductivo guiado por ultrasonido es una técnica no solo utilizada exclusivamente con el propósito informativo, sino que también se usa como ayuda en la recogida de muestras, tejidos o fluidos (por ejemplo, aspiración de oocitos, biopsia de tejido lúteo) y como "guía" para insertar sustancias farmacológicas o material biológico (semen) dentro del útero (Campos, 2017).

### 3.2.2 Doppler pulsado.

El principio de la ecografía Doppler se basa en el movimiento de las células sanguíneas en relación con el transductor, de modo que los cambios en la velocidad y dirección del flujo están representados por imágenes con colores y tonos específicos (Ginther, 2007). La gama de colores se puede calcular a través del porcentaje de tejido/estructura con color o mediante un software, que cuenta el número de píxeles (Ginther, 2014).

La ecografía Doppler tiene dos modos de acción distintos que permiten el acceso al flujo de sangre. Uno es el espectral o pulsado, en el que la variación de la velocidad del flujo sanguíneo. La sangre está representada por un gráfico de forma de onda, donde se puede observar los indicadores de perfusión tisular como pico de velocidad sistólico (PVS), pico velocidad diastólica (PVD) y flujo de mayor velocidad media (FMVM). La relación de las tres velocidades medidas (PVS, PVD FMVM) se calculan para obtener el índice de resistencia (RI) y pulsatilidad (PI). Los valores de RI y PI pueden oscilar entre 0 y 4, siendo 0 sin cambios y el valor máximo (Ginther, 2007). La medición adecuada de las velocidades del flujo sanguíneo durante el examen espectral depende de la angulación correcta (ángulo Doppler) entre el transductor y el vaso sanguíneo evaluado (Ginther, 2007). Debido a la gran tortuosidad de las arterias, presentes en el endometrio, los ovarios y útero, no se pueden determinar los respectivos ángulos Doppler. Sin embargo, las tasas de RI y PI no se ven influenciadas por esta angulación, por lo que están indicados para la evaluación espectral del aparato reproductor de yeguas (Silva, 2005; Ferreira et al., 2008; Ferreira, 2013; Ginther, 2014). RI y PI tienen una correlación

negativa con la perfusión vascular del tejido irrigado por la arteria en cuestión, es decir, el aumento de RI o de PI indica un aumento de la resistencia y, en consecuencia, una disminución de la perfusión tejido vascular (Ginther, 2014).

### 3.2.3 Doppler color/power Doppler.

El otro modo es Doppler color-flow/power-flow, con el que la velocidad del flujo sanguíneo puede ser visualizado por la intensidad de los píxeles de color (puntos), de oscuro a claro, siendo ese color oscuro indica baja velocidad y la luz indica alta velocidad. El flujo está dirigido al transductor que está codificado en rojo y el flujo de salida está codificado en azul (Ginther y Utt., 2004).

El Doppler color flow está representado por una imagen con más de un color, que no representa necesariamente sangre arterial o venosa, sino más bien la dirección en la que el flujo sanguíneo cambia en relación con el transductor, es decir, tiene un color en caso de que la sangre "se acerque" al transductor y otro, en caso de que la sangre "se aleje" del transductor. El Power flow está compuesto por un solo tono de color que varía según con la cantidad de células sanguíneas en movimiento y no depende del ángulo de Incidencia de rayos de ondas. En el modo power-flow, se pueden detectar vasos pequeños y/o con flujo muy lento, lo que permite detectar posibles cambios sutiles en la vascularización. Cabe destacar que la vascularización se gradúa por intensidad, cantidad y tamaño de los píxeles de colores (Ginther et al., 2007a).

La imagen formada se basa directamente en la variación de frecuencia y la dirección del flujo sangre, y en el caso de doppler color también se basa indirectamente en el ángulo en el que los rayos ultrasónicos están dirigidos. Con el fin de obtener una buena imagen Doppler, el operador debe programar que la onda emitida por el transductor tenga entre 30 y 60 grados (Ginther y Utt., 2004). Los índices más fiables que se deben medir para calcular la velocidad del flujo sanguíneo del tracto reproductivo son RI y PI . Cuánto mayor es el RI, menor es la perfusión vascular y cuanto mayor es el PI, menor es la perfusión sanguínea en tejidos distantes (Ginther y Utt., 2004).

El power doppler tiene algunas desventajas en comparación con el doppler color. Una es la mayor susceptibilidad del power doppler para mostrar los destellos de artefactos, que si son excesivos podría impedir su uso (Bude y Rubin, 1996; Rubens et

al., 2006). Otra desventaja es su falta de información de flujo direccional o de velocidad (Bude y Rubin, 1996).

### 3.2.4 Doppler color como herramienta de exploración del aparato reproductor de la yegua

La ecografía Doppler color se empezó a utilizar en yeguas para evaluar la vascularización de la pared folicular. Los primeros estudios se basaron en la información obtenida en las grandes arterias (ovárica, uterina y vaginal) responsables de la vascularización sanguínea del aparato reproductor femenino (Gastal y Gastal, 2012). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado la utilidad de la valoración Doppler directamente en la estructura diana, como el endometrio, la pared folicular o el CL (Silva, 2005; Silva y Ginther, 2006; Ginther et al., 2008; Ferreira et al., 2008; Ferreira, 2011). Así, la ultrasonografía Doppler color es una técnica usada para evaluar el estado de luteolisis de una forma rápida, fácil y económica (Miró, 2015).



*Fig. 3 Evaluación ecográfica de una yegua en Yeguada Miguel Ángel de Cárdenas. Archivo personal.*

Actualmente, la ecografía Doppler es la técnica más utilizada que permite la valoración del flujo sanguíneo del CL durante el diestro y también después de la administración de tratamientos hormonales (Castro et al., 2016), lo que permite un conocimiento más profundo de la fisiopatología reproductiva de una yegua.

Al evaluar la arteria uterina en la fase lútea temprana, las yeguas presentan un RI bajo, lo que indica una disminución de la impedancia al flujo sanguíneo en la vasculatura distal y, por lo tanto, un aumento de la perfusión uterina. Es lógico que el suministro de

sangre uterina sea mayor en la fase lútea temprana, lo que se corresponde con el momento de la llegada del embrión al útero. De hecho, el aporte de sangre uterina es importante para la nutrición del embrión y el reconocimiento materno y sus cambios pueden influir en la pérdida embrionaria en yeguas (Bollwein et al., 2003). En 1998 Bollwein et al., demostraron que una alta resistencia vascular del útero en yeguas multíparas mayores ocurre como resultado de la fibrosis, y puede ser una causa de infertilidad en estos animales (Bollwein et al., 1998).

En un estudio sobre la desviación y selección de folículos en el que se utilizó el Doppler color, Acosta et al. (2002), demostraron que el PVS y FMVM empezaron a disminuir disminuyeron en el futuro folículo subordinado más grande y continuó aumentando en el futuro folículo dominante. Esta diferencia se inició 2 días antes del inicio de la diferencia más evidente entre el folículo subordinado y el dominante. Estos hallazgos permiten a los veterinarios identificar el folículo dominante antes del desarrollo del diámetro.

Otra investigación basada en ultrasonografía en modo B, describe una banda anecoica progresiva, que aumenta en el área entre las capas de la teca durante los 3 días antes de la ovulación (Gastal et al., 2006a). Estos mismos autores, durante las últimas 4 h antes de la ovulación, demostraron, con doppler color, que ocurre una disminución progresiva en el porcentaje de la pared del folículo con disminución en las señales de color. En otro estudio (Carnevale et al., 2002) se concluyó que varios valores medios de píxeles aumentaron de una manera aproximadamente lineal durante las 14 h antes de la ovulación en los pacientes tratados con hCG yeguas. Todo esto puede permitir a los profesionales predecir con cierto grado de seguridad el tiempo de ovulación y el mejor momento para la inseminación.

### 3.3 VALORACIÓN REPRODUCTIVA DE LA YEGUA: EXAMEN TRANSRECTAL

La palpación transrectal es una herramienta diagnóstica habitual en la clínica equina reproductiva (Brinsko et al. 2010) que permite evaluar el cuello y tono uterino, sensibilidad ovárica al tacto y presión, consistencia de folículos ováricos y detección de quistes. Asimismo, se puede verificar que después de la ovulación hay un aumento del tono uterino y cérvix como consecuencia del incremento de los niveles de P4 verificado

en esta fase del ciclo estral (McKinnon et al., 2011). Este tipo de valoraciones no se pueden llevar a cabo utilizando solo la ecografía. Sin embargo, si a la palpación transrectal se le une el estudio ultrasonográfico Doppler, para estudiar otros mecanismos reproductivos, se puede valorar el aparato reproductor en profundidad (Bollwein et al., 2002a; Acosta et al., 2004a; Silva y Ginther, 2006).

### 3.3.1 Evaluación óvarica

Actualmente, detección precoz del inicio de la actividad folicular y control de todo el ciclo estral de una yegua es fundamental para implementar un manejo reproductivo adecuado. A través de ultrasonografía Doppler, es posible determinar el potencial ovulatorio de los folículos dominante durante el período de transición primaveral (Acosta y Miyamoto, 2004). Esto es debido a que los cambios en la hemodinámica ovárica se pueden detectar a lo largo del desarrollo folicular y están relacionados con la remodelación del tejido ovárico y el sistema vascular responsable de su vascularización (Ginther et al., 2007b).

El periodo de la transición primaveral, que precede al inicio de la actividad reproductiva, se caracteriza por el desarrollo de ondas foliculares anovulatorias. Durante esta fase, los folículos dominantes anovulatorios tienen una tasa de crecimiento y dimensiones similares a observado durante la temporada reproductiva. No obstante, un aumento progresivo de la vascularización de la divergencia folicular ocurre solo en futuros folículos ovulatorios, mientras que los folículos anovulatorios tienen baja vascularización independientemente del diámetro que tengan (Acosta et al., 2004b). Se ha descrito que esta disminución de la vascularización de folículos anovulatorios se relaciona con la baja concentración de LH durante este período de transición (Ginther et al., 2003). La evaluación Doppler color del flujo sanguíneo folicular se ha utilizado como un método eficaz para predecir la viabilidad folicular y cambios hemodinámicos (Gastal et al., 2006c; Ginther et al., 2007c; Campos 2017; Requena et al., 2021).

Los folículos ováricos contienen líquido folicular de color amarillo anaranjado pálido, que está representado ecográficamente por una imagen negra (anecogénica). El examen de ultrasonido de una yegua en celo permite la evaluación del crecimiento folicular, cambios de forma, características de la pared y líquido folicular, y también para evaluar el patrón de edema uterino. El folículo dominante aumenta de diámetro en un

promedio de 3 mm por día. El tamaño máximo folicular a menudo se alcanza 1-2 días antes de la ovulación. La ovulación, que según Townson y Ghinter (1987) ocurre en menos de 60 segundos, puede ser reconocida por una rápida disminución del tamaño folicular después de haber visualizado previamente un folículo grande y/o la presencia de una estructura colapsada (Ginther, 1988). Desde el punto de vista clínico, se recomienda registrar, durante de 1 a 4 días, el tamaño de los folículos que presenten un diámetro igual o mayor de más de 30 mm en ambos ovarios, ya que este procedimiento permite al operador rastrear el crecimiento folicular, monitoreando el número de ovulaciones, y prediciendo la potencial gestación (Camilo et al., 2004; Samper, 2008; Campos, 2017).

Según Gastal et al. (2006c), la vascularización folicular es máxima 24 horas antes de la ovulación y hay una disminución abrupta de perfusión sanguínea folicular durante las 4 horas anteriores a la ovulación. Ginther (2007a) describió cambios en la perfusión sanguínea en un folículo horas antes ovulación, y en las cuatro horas previas a la ovulación el porcentaje de flujo registrado por la disminución de Doppler. Las células de la granulosa cambian a medida que lo que aumenta la vascularización de la teca en el lado opuesto al ápice del folículo. esta región se llama fosa ovulatoria, donde se produce la rotura folicular. Se registra la ovulación como un evento lento y hay buena vascularización en el ápice folicular correspondiente.

Además, la ultrasonografía también puede ayudar a diferenciar las condiciones anormales de ovario, como folículos anovulatorios y tumores ováricos (Campos, 2017). Por lo tanto, la ultrasonografía es fundamental en el examen reproductivo. Debido a la configuración anatómica del ovario de la yegua, la palpación transrectal del CL por el recto no es factible. De hecho, en la yegua, el CL se forma dentro del ovario y no sobresalen por encima de la superficie del ovario como ocurre en otras especies (Squires et al., 1988).

Algunas de las indicaciones para la evaluación ecográfica del CL son: (1) para detectar la ovulación; (2) a evaluar la formación de CL; (3) determinar el tamaño y las características del CL; (4) para determinar si el fracaso de una yegua para mostrar estro es causado por el mantenimiento prolongado de un CL o por la ausencia de CL y actividad folicular; (5) para distinguir entre anovulados folículos hemorrágicos, folículos no rotos luteinizados y CL; y finalmente (6) para determinar si un yegua ha ovulado más de un folículo (Silva Gomes, 2008).

Al usar la ultrasonografía modo B a tiempo real, el CL de la yegua se puede identificar en un promedio de 17 días después de la ovulación o hasta cinco días antes de la ovulación subsiguiente (Pierson y Ginther, 1985). Las propiedades ultrasónicas de algunos cuerpos lúteos maduros son similares a las del estroma del ovario. Sin embargo, el tejido lúteo se puede distinguir normalmente del estroma por un margen, que está formado en parte por la diferencia en la impedancia acústica de los tejidos (Pierson y Ginther, 1985).

Aproximadamente el 50% de los CL se caracterizan por una cavidad central no ecogénica, llena de sangre (Pierson y Ginther, 1985). A pesar de las diferencias morfológicas entre las estructuras lúteas, con y sin zona ecogénica central, esto no parece ser funcionalmente significativo, ya que la cantidad de tejido lúteo no es diferente entre los dos tipos de CL y no interfiere con la longitud de los intervalos interovulatorios (Townson et al., 1989).

Según la porción ecogénica de la glándula luteal, el brillo y el contraste de la escala de grises parece dar indicación de la hemodinámica lútea (Pierson y Ginther, 1985). Las imágenes de ultrasonido del CL se ven afectadas por la cantidad de sangre que contiene. La sangre es semi-ecogénica y el suero no es ecogénico, mientras que el estroma lúteo opuesto es ecogénico. Generalmente, la luteinización se observa primero en la periferia de la estructura lútea. A medida que el CL envejece y la sangre se reabsorbe normalmente, desarrollándose de una estructura lútea sólida que es uniformemente ecogénica. En general, el CL es mayoritariamente ecogénico el día 0 o 1 después de la ovulación. Este probablemente sea el resultado de las propiedades ultrasónicas del folículo colapsado (Squires et al., 1988).

La ecogenicidad del CL disminuye durante los primeros seis días del diestro, permanece en un nivel mínimo durante varios días durante la mitad del diestro y luego aumenta en los días 12 al 16 (Pierson y Ginther, 1985). Este aumento de brillo durante la regresión CL es indicativo de una disminución del flujo sanguíneo, aumento de la densidad del tejido e infiltración de fibrina (Pierson y Ginther, 1985).

### 3.3.2 Evaluación uterina

Las yeguas en celo, por lo general, tiene edema en el endometrio que se presenta con la forma característica de "rueda de carro" o "gajos de naranja". El edema se presenta por los altos niveles en sangre de estrógeno y niveles bajos de progesterona. El patrón de edema cambia durante la evolución del estro y se utilizan sistemas de puntuación para valorar los patrones de edema uterino (Samper y Pycock, 2007). Generalmente, los niveles de edema (tabla 3) aumentan a medida que crece el folículo dominante, alcanzando su punto máximo 1-2 días antes de la ovulación. El edema desaparece 24 horas antes de la ovulación porque se invierte los niveles hormonas de forma que hay una disminución de estrógeno y un aumento de progesterona (Carnevale y Olsen, 2011). Por el contrario, el útero de la yegua en diestro (fase luteínica) aparece tubular y con ecogenicidad homogénea, desprovisto de edema (Aurich, 2011).

Se requiere una interpretación cuidadosa en la evaluación del edema uterino, ya que las enfermedades inflamatorias también pueden causar edema. De forma fisiológica, una yegua con estro normal puede presentar en el útero una pequeña cantidad líquido claro (no ecogénico). Sin embargo, un aumento en el volumen de líquido ecogénico sugiere inflamación uterina. En ocasiones, es posible que este líquido no se detecte fácilmente antes de que el edema uterino disminuya (McKinnon et al., 2011)

Tabla 3. Evaluación del grado de edema en yeguas. Adaptado de McKinnon et al., 2011)

<b>GRADOS DE EDEMA UTERINO</b>		
<i>Nivel de edema</i>	<i>Cantidad de edema</i>	<i>Descripción</i>
0	Inexistente	<i>Ausencia de edema. Los pliegues endometriales no se ven individualmente.</i>
1	Leve	<i>Pliegues endometriales adoptan forma de "rueda de carro" en el inicio del estro.</i>
2	Moderado	<i>Aumento del espesor de pliegues endometriales. Inflamación en útero. Ocurre a mitad del estro. Típico por aumento de E2 (1-2 días antes de la ovulación).</i>
3	Abundante	<i>Pliegues endometriales muy distendidos. Inflamación exagerada. Se asocia a inflamación uterina.</i>

### 3.3.3 Diagnóstico de gestación y viabilidad ovárica

Como regla general, el primer diagnóstico de gestación con ecografía en modo B se realiza cuando 14-17 días después de la ovulación. En caso de que el primer diagnóstico sea positivo, se debe realizar un segundo diagnóstico entre los días 30 y 45 de gestación. Este segundo examen es fundamental porque la incidencia de reabsorción embrionaria varía entre el 5 y el 15% (Vanderwall, 2011) y tiene lugar entre el 14 y el 40 de gestación de la yegua.

En las yeguas, hay un marcado aumento en el flujo sanguíneo uterino desde las primeras horas después de hacer la inseminación artificial hasta las ocho horas post inseminación. Se cree que este fenómeno está relacionado con el transporte de espermatozoides y el proceso de limpieza uterina (Ferreira et al., 2015). Además de la motilidad normal de los espermatozoides, las contracciones del miometrio son esencial para que los espermatozoides sean transportados al sitio de fertilización durante las primeras horas después de la introducción del semen en el aparato reproductor femenino. Asimismo, después del apareamiento, se produce un proceso inflamatorio fisiológico y transitorio que tiene como objetivo eliminar el exceso de semen, restos celulares y posibles contaminantes del tracto reproductivo de la yegua (Troedsson, 1999).

En 2005, Silva et al. concluyeron que tanto las yeguas gestantes como las no gestantes tienen similitudes en la vascularización endometrial baja en los primeros ocho días después de la ovulación. Sin embargo, entre el día 11 y 13 después de la ovulación se detecta un aumento de la perfusión vascular en el cuerno uterino que tiene el embrión móvil (Ginther, 2014).

El diagnóstico de gestación en una yegua puede hacerse a los 11 días de la ovulación, en ese momento ya es posible ver una vesícula embrionaria (que crece 1,5 mm diarios), sin embargo, la vesícula embrionaria todavía tiene movilidad intrauterina, lo que requiere una exploración meticulosa para evitar falsos negativos (Campos, 2017).

## 4 MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 ANIMALES

Se evaluaron 30 yeguas de Pura Raza Española con un rango de edad entre 4 y 19 años (con un promedio de 9.3) y un peso que osciló entre los 600 y 700 kg. Los animales presentaron una puntuación alta en condición corporal (puntuación 8) durante todo el periodo experimental de esta la investigación (Beneke et al., 1983). Todas las yeguas tenían un tracto reproductivo normal, una duración típica de los ciclos estrales, estaban libres de enfermedades infecciosas y se alojaron en establos con acceso *ab libitum* al agua, heno y sal mineral. Las yeguas, con el fin de poder valorar el efecto de la edad, se dividieron en dos grupos: jóvenes (<8 años, n = 15) y maduras ( $\geq 8$  años, n = 15). La fase experimental se llevó a cabo en la ganadería “Miguel Ángel de Cárdenas”, ubicada en la Finca San Pablo (Écija, Sevilla, España). El manejo se hizo siguiendo los requisitos exigidos por la Universidad de Córdoba sobre bienestar y experimentación animal.

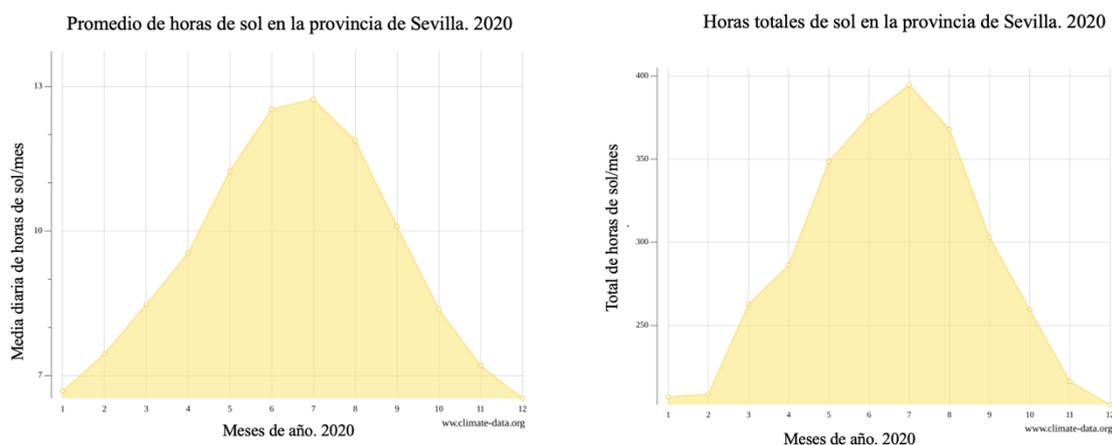


Fig. 4 Promedio y total de horas de sol registradas en la provincia de Sevilla en el año 2020. [www. Climate-data.org](http://www.Climate-data.org).

## 4.2 MANEJO DE LAS YEGUAS

Todas las yeguas de este estudio se sometieron a un examen clínico general y ginecológico previo para descartar posibles patologías reproductivas y determinar el momento del ciclo en el que se encontraban. Mediante ecografía se comprobó que estuvieran en celo con un folículo preovulatorio de 35 mm de diámetro o superior, así como edema endometrial, y mediante palpación rectal se comprobó que tuvieran tono cervical, como describieron Brogan et al. en 2016. Posteriormente se les administró vía intravenosa una dosis de 3000 UI de hCG (VETERIN CORION®) para inducir la ovulación. En todas ellas, la ovulación se registró entre las 24 y las 48 h posteriores a la administración de la hCG mediante ecografía.

La inseminación artificial se realizó con semen refrigerado obtenido de sementales de la propia yeguada. En este estudio, se decidió evitar la sedación de las hembras para prevenir los posibles efectos vasodilatadores del sedante, aunque minimiza los artefactos en la grabación de video Doppler color. A los 14 días post-inseminación, se realizó el diagnóstico de gestación mediante ecografía.



*Fig. 5. Inseminación artificial a una de las yeguas del estudio. Archivo personal.*

### 4.3 ULTRASONOGRAFIA

Las valoraciones ultrasonográficas se realizaron con un ecógrafo modo B y Doppler (MyLabOneVet, ESAOTE, Barcelona, España). El dispositivo estaba equipado con un transductor lineal multifrecuencia de 6 a 10 MHz. Todas las ecografías las hizo la misma persona para minimizar las posibles diferencias en la captación y, en consecuencia, la interpretación de las imágenes ecográficas. Las imágenes siempre se capturaron con la misma configuración (frecuencia de 10 MHz, 70% de ganancia en modo B y 40% de power doppler) y se almacenaron en el mismo ecógrafo para su posterior análisis. Para la toma de imágenes de power doppler, se hizo un video de 30 s de cada estructura, del cual se seleccionaron tres imágenes representativas. Las imágenes elegidas se analizaron con la versión on-line del software Image Color Summarizer®. Este programa permite la cuantificación del porcentaje de píxeles de colores que existen en una imagen, representativos del flujo sanguíneo ovárico. Esta técnica transforma un análisis cualitativo en uno cuantitativo. El usuario solo tiene que introducir el archivo y procesar la imagen seleccionada. Con el sumatorio de todos los píxeles de colores, se obtiene el porcentaje de flujo sanguíneo existente.

Se realizó un examen minucioso y en profundidad de los ovarios y el útero de cada una de las yeguas para conseguir una interpretación correcta de la dinámica folicular. Las imágenes power doppler grabadas se tomaron de yeguas con folículos preovulatorios de 35 mm (Fig 8), que coincidían con la administración de hCG (inducción de la ovulación). Se asumió el tiempo de ovulación entre 24 y 48 h después de la administración de hCG. El examen ecográfico del CL fue realizado entre los 5-6 días post-ovulación. Junto con el examen de ambos ovarios, también se registraron imágenes del útero para un análisis más completo de la perfusión vascular uterina. Se llevó a cabo la medición de los índices PI/RI de la arteria uterina, con el registro de al menos dos ciclos cardíacos consecutivos, según describió Bolwein et al, 1998.

Con el fin de minimizar posibles errores y obtener los valores más representativos de cada evaluación ecográfica, se hizo una media con los valores de 3 de imágenes registradas del total de cada una de las yeguas.

#### 4.4 VALORACIÓN DE LA PROGESTERONA

Se obtuvieron muestras de sangre de la vena yugular utilizando vacutainer de 4 mL heparinizados el mismo día de la evaluación ecográfica del CL (5-6 días post-ovulación). La sangre obtenida se centrifugó (1000 g durante 10 min a 18-25° C) y plasma decantado se almacenó a -20° C hasta el estudio de la progesterona. La progesterona se evaluó con el método comercial ELISA EIA-5223 (DRG Instruments GmbH, Marburg, Alemania) que se dedica específicamente a la especie equina (Dufour et al., 2021).

#### 4.5 ESTUDIO ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se utilizó SAS University Edition 3.8 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Las pruebas estadísticas utilizadas han sido las siguientes:

- Estadísticos descriptivos de todas las variables para presentar un resumen del conjunto de datos obtenidos.

- Prueba de Kolmogorov-Smirnov para estudiar la normalidad en la distribución de los datos y comprobar, si la variabilidad de la muestra puede ser la causa de los resultados de esta investigación.

- La comparación de medias se ha realizado a través del análisis de la varianza (ANOVA).

- El coeficiente de correlación de Pearson es una prueba paramétrica. Se ha utilizado para medir la relación lineal entre las variables. La interpretación de este coeficiente tiene como norma que solo cuenta valores entre 1 y -1, el 0 demuestra que no existe correlación. Los valores cercanos a 1 indican una correlación muy buena y los cercanos a 0 una correlación escasa o nula (Witte y John, 2017).

- El procedimiento GLM se utilizó para investigar las diferencias en los parámetros de ultrasonido y concentraciones de progesterona en plasma sanguíneo debido a la edad. El análisis de regresión en el procedimiento GLMSELECT se utilizó para investigar la relación entre las concentraciones de P4 y FSCL. El rendimiento del modelo se evaluó mediante el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), la raíz del cuadrado medio del error de predicción (RMSPE), el RMSPE expresado como una proporción de la media observada

(% RMSPE) y el coeficiente de correlación de concordancia (CCC). Además, el cuadrado medio del error de predicción (MSPE) se descompuso en sesgo medio (medida de precisión), sesgo de pendiente (medida de precisión) y error aleatorio. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Resultados del objetivo 1

Todas las yeguas (n=30) ovularon dentro las primeras 48 h ( $38.8 \pm 1.3$  h) después de recibir el tratamiento con hCG. En la tabla 4 se presentan los resultados de las medidas morfométricas (diámetro folículo preovulatorio y área del cuerpo lúteo posterior) y mediante power-doppler el flujo hemodinámico de dichas estructuras, así como la concentración de progesterona en plasma, en los distintos grupos de edad estudiados. Las concentraciones obtenidas de esta hormona demuestran que el CL era funcional.

*Tabla 4. Estadísticos descriptivos (media  $\pm$  desviación estándar (SD), mínimo (Min) y máximo (Max)) de los parámetros ultrasónicos del folículo y cuerpo lúteo y de la concentración plasmática de progesterona de las yeguas incluidas en esta investigación (n=30).*

Parámetros	GRUPOS DE EDAD								
	JÓVENES			MADURAS			TOTAL		
	Media $\pm$ SD	Min	Máx	Media $\pm$ SD	Min	Máx	Media $\pm$ SD	Min	Máx
Diámetro folículo preovulatorio (mm)	43.67 $\pm$ 2.94	38.60	49.00	42.12 $\pm$ 2.58	38.40	46.30	42.89 $\pm$ 2.83	38.40	49.00
Flujo sanguíneo del folículo preovulatorio (%)	8.00 $\pm$ 1.59	5.68	11.20	6.63 $\pm$ 1.31	4.20	8.53	7.31 $\pm$ 1.59	4.20	11.20
Área CL (mm)	7.79 $\pm$ 1.23	4.38	9.50	7.12 $\pm$ 1.27	4.38	8.63	7.46 $\pm$ 1.27	4.38	9.50
Flujo sanguíneo CL (%)	21.09 $\pm$ 2.0	16.65	23.85	16.78 $\pm$ 3.29	12.21	22.53	18.94 $\pm$ 3.46	12.21	23.85
Progesterona (ng/mL)	8.15 $\pm$ 0.46	7.36	8.90	5.04 $\pm$ 0.65	4.20	6.30	6.60 $\pm$ 1.68	4.20	8.90

Las yeguas jóvenes presentaron valores más altos en todos los parámetros estudiados que las maduras.

El estudio de correlación de Pearson, de todas las variables morfométricas estudiadas, del flujo vascular de las mismas y la concentración de progesterona, teniendo en cuenta la edad, se muestra en la tabla 5 así como las diferencias significativas entre cada una de las variables.

Tabla 5. Correlaciones bilaterales existentes entre los parámetros ecográficos teniendo en cuenta la edad (n=30). \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

	Edad	FSFP	DFP	FSCL	ACL	P4	Edad $\geq 8$
Edad total	1	.412*	-.375*	-.441*	-.112	-.743**	.794**
FSFP (%)		1	-.106	.255	.207	-.004	.134
DFP (mm)			1	.164	-.084	.238	-.279
FSCL (%)				1	.629**	.726**	-.634**
ACL(mm <sup>2</sup> )					1	3.51	-.267
P4 (ng/ml)						1	-.944**
Edad $\geq 8$							1

**Nota:** FSFP: Flujo sanguíneo del folículo preovulatorio; DFP: Diámetro folículo preovulatorio; FSCL: Flujo sanguíneo del cuerpo lúteo; ACL: Área del cuerpo lúteo; P4: progesterona.

Con respecto a la edad total se apreciaron correlaciones positivas ( $p \leq 0.05$ ) con el flujo sanguíneo del folículo preovulatorio; así mismo, se encontraron correlaciones negativas ( $p \leq 0,05$ ) para el diámetro del folículo preovulatorio y el flujo sanguíneo del cuerpo lúteo y una fuerte correlación negativa ( $p \leq 0,01$ ) con la progesterona. Las yeguas mayores de 8 años (maduras) presentaron diferencias muy significativas en todos los parámetros con respecto a la edad conjunta de todas las yeguas. Así mismo, las maduras presentaron una correlación negativa ( $p \leq 0,01$ ) con el flujo sanguíneo del cuerpo lúteo y la progesterona.

El flujo sanguíneo del cuerpo lúteo presenta correlaciones muy significativas y positivas ( $p \leq 0,01$ ) con el área del cuerpo lúteo y la concentración de progesterona. Sin embargo, esta correlación es negativa a medida que aumenta la edad (mayores de 8 años).

Con respecto a la P4 se aprecia una correlación inversa muy significativa ( $p \leq 0,01$ ) de esta hormona a medida que aumenta la edad.

En todas las yeguas incluidas en este estudio no existe correlación significativa del flujo sanguíneo del folículo preovulatorio, ni del diámetro del folículo preovulatorio ni tampoco del área del cuerpo lúteo con las demás variables analizadas.

## 5.2 Resultados del objetivo 2.

En la tabla 6 se presenta la comparación estadística y sus diferencias significativas entre los dos grupos de edad. Las yeguas jóvenes presentaron mayor flujo sanguíneo del folículo preovulatorio ( $p < 0.05$ ), flujo sanguíneo del cuerpo lúteo ( $p < 0.001$ ) y niveles de progesterona en plasma ( $p < 0.001$ ). El área del cuerpo lúteo y el diámetro folicular no fueron significativos.

Tabla 6. Medias de mínimos cuadrados de parámetros ultrasónicos y concentraciones de progesterona.

Parámetros	GRUPO DE EDAD		SEM <sup>1</sup>	p
	JÓVENES	MADURAS		
Diámetro folículo preovulatorio (mm)	43.67	42.12	0.51	0.13
Flujo sanguíneo folículo preovulatorio (%)	8.00	6.63	0.29	<0.05
Área del cuerpo lúteo (mm <sup>2</sup> )	7.79	7.12	0.23	0.15
Flujo sanguíneo del cuerpo lúteo (%)	21.09	16.78	0.63	<0.001
Progesterona (ng/ml)	8.15	5.04	0.30	<0.001

Los mejores modelos de regresión obtenidos en el presente estudio para predecir las concentraciones de P4 a partir de los datos de flujo sanguíneo del cuerpo lúteo que se muestran en la tabla 7 se presentan en las ecuaciones 1 (todos los datos), 2 (yeguas jóvenes) y 3 (yeguas maduras):

Tabla 7. Ecuaciones obtenidas de los modelos de regresión

$P_4 \text{ (ng/ml)} = -0.392 (\pm 1.1418) + 0.369 (\pm 0.0593) \times \text{FSCL}$ $R^2 = 0.58; \text{RMSPE} = 1.01 \text{ ng/ml}; \% \text{RMSPE} = 16.2 \%; \text{CCC} = 0.73$ $p < 0.001$	(1)
$P_4 \text{ (ng/ml)} = 4.878 (\pm 0.9960) + 0.1555 (\pm 0.0470) \times \text{FSCL}$ $R^2 = 0.46; \text{RMSPE} = 0.33 \text{ ng/ml}; \% \text{RMSPE} = 4.0 \%; \text{CCC} = 0.63$ $p < 0.01$	(2)
$P_4 \text{ (ng/ml)} = 2.966 (\pm 0.7313) + 124 (\pm 0.0428) \times \text{FSCL}$ $R^2 = 0.39; \text{RMSPE} = 0.49 \text{ ng/ml}; \% \text{RMSPE} = 9.7 \%; \text{CCC} = 0.56$ $p < 0.05$	(3)

Los tres modelos fueron significativos y mostraron precisión moderada, precisión moderada a alta y reproducibilidad de moderada a débil según los valores de R<sup>2</sup> (coeficiente de determinación), RMSPE (raíz de error cuadrático medio), % RMSPE (raíz de error cuadrático medio expresada como proporción de la media observada) y CCC (coeficiente de correlación de concordancia). Además, la precisión y la exactitud se vieron reforzadas por el hecho de que ninguno de los modelos mostró sesgo medio o lineal, con casi el 100% de MSPE (predicción de error cuadrático medio) debido a un

error aleatorio. La mejor ecuación en términos de precisión y reproducibilidad fue la ecuación 1, pero tuvo menos precisión que las otras dos ecuaciones.

### 5.3 Resultados del objetivo 3.

En la tabla 8 se presentan los estadísticos descriptivos del conjunto de las yeguas estudiadas, los días 6 y 14 post-ovulación (media  $\pm$  desviación estándar (DS) de la edad, la concentración de P4 y de los índices PI, RI, tasa de gestación, relación PI/RI y grupo de edad < de 8 años.

Tabla 8. Estadísticos descriptivos del conjunto de las yeguas estudiadas en los días +6 y +14 post-ovulación

Variables	Día 6		Día 14
	n	Media $\pm$ DS	Media $\pm$ DS
Edad	30	9.03 $\pm$ 4.140	--
Progesterona (ng/mL)	30	6.60 $\pm$ 1.67	--
Índice pulsatibilidad (PI)	30	2.80 $\pm$ 0.37	2.34 $\pm$ 0.69
Índice de resistencia (RI)	30	0.85 $\pm$ 0.47	0.72 $\pm$ 0.15
Gestación (%)	30	--	53
Relación PI/RI	30	3.26 $\pm$ 0.34	3.20 $\pm$ 0.41
Edad < 8 (%)	30	0.50	0.50

En la tabla 9 se presentan las tasas de gestación teniendo en cuenta los grupos de edad obtenidas en esta investigación en la primera inseminación artificial del ciclo estudiado para cada yegua.

Tabla 9. Tasas de gestación por grupos de edad.

Yeguas	Preñadas	Vacías
Jóvenes (n=15)	65,50%	34,50%
Maduras (n=15)	40%	60%
Total (n=30)	53,30%	46,70%

Del total de yeguas estudiadas, sin tener en cuenta los grupos de edad, se obtuvo una tasa de gestación a la primera inseminación del 53,30%. Atendiendo a grupos de edad, se obtuvo un 65,50% de gestación para jóvenes frente a un 40% para maduras.

Tabla 10. Correlaciones bilaterales existentes entre los parámetros ecográficos teniendo en cuenta la edad ( $n=30$ ). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

CORRELACIONES BILATERALES							
	Edad	P4	PI	RI	Gestación	PI/RI	Edad > 8
Edad	1	-.743**	.853**	.762**	-.321	.633**	.794**
P4 (ng/mL)		1	-.637**	-.668**	.290	-.452*	-.944**
PI			1	.602**	-.461*	.908**	.652**
RI				1	-.180	.218	.755**
Gestación (%)					1	-.482**	-.267
PI/RI						1	.414*
Edad > 8							1

**Nota:** P4: progesterona; PI: Índice de pulsatibilidad; RI: Índice de resistencia; PI/RI: Ratio entre índice de pulsatibilidad e índice de resistencia; Edad > 8 (%): grupo de edad madura.

Tal y como se demuestra en la tabla 10, se apreciaron correlaciones positivas ( $p \leq 0,01$ ) entre la edad con los índices PI, RI así como relación PI/RI, y el grupo de yeguas mayores de 8 años, y correlación negativa ( $p \leq 0,01$ ) con la progesterona. Con respecto a la progesterona se aprecia una correlación negativa muy significativa ( $p \leq 0,01$ ) de esta hormona con los índices uterinos (PI y RI), la relación entre ambos, y la edad. El PI tiene una correlación positiva ( $p \leq 0,01$ ) con el RI, la ratio PI/RI y con el aumento de la edad, sin embargo tiene una correlación negativa ( $p \leq 0,05$ ) con la tasa de gestación en todas las yeguas en general sin influir la edad. El RI tiene una correlación positiva ( $p \leq 0,01$ ) con el aumento de la edad, lo que indica que éste será mayor a mayor edad de la yegua, sin influir si está o no gestante. La tasa de gestación se correlaciona inversamente con la ratio PI/RI ( $p \leq 0,01$ ). La ratio PI/RI tiene correlación positiva con el grupo de mayor edad

A continuación se presentan los resultados de los índices uterinos teniendo en cuenta la edad y el estado de gestación de las yeguas evaluadas

Tabla 11. Estadísticos descriptivos de las yeguas jóvenes, evaluadas los días 6 y 14 post-ovulación (media  $\pm$  desviación estándar (DS); mínimo y máximo) teniendo en cuenta su estado de gestación.

YEGUAS JÓVENES									
Variables	VACÍAS			PREÑADAS			TOTAL		
	Media $\pm$ SD	Min	Máx	Media $\pm$ SD	Min	Máx	Media $\pm$ SD	Min	Máx
PI Día 6	2.68 $\pm$ 0.17	2.43	2.90	2.50 $\pm$ 0.21	2.10	2.80	2.56 $\pm$ 0.21	2.10	2.90
RI Día 6	0.83 $\pm$ 0.03	0.79	0.86	0.82 $\pm$ 0.3	0.76	0.87	0.82 $\pm$ 0.03	0.76	0.87
Relación PI/RI Día 6	3.24 $\pm$ 0.24	2.83	3.45	3.06 $\pm$ 0.24	2.69	3.41	3.12 $\pm$ 0.25	2.69	3.45
PI Día 14	2.56 $\pm$ 0.37	1.95	2.85	1.62 $\pm$ 0.16	1.32	1.88	1.93 $\pm$ 0.52	1.32	2.85
RI Día 14	0.81 $\pm$ 0.13	0.57	0.88	0.55 $\pm$ 0.07	0.43	0.66	0.64 $\pm$ 0.16	0.43	0.88
Relación PI/RI Día 14	3.19 $\pm$ 0.22	2.83	3.42	2.97 $\pm$ 0.34	2.63	3.60	3.04 $\pm$ 0.31	2.63	3.60

Tabla 12. Media de mínimos cuadrados de los parámetros uterinos en el día +6 y +14 en yeguas jóvenes comparando los grupos de vacías vs preñadas

YEGUAS JÓVENES				
Variables	VACÍAS	PREÑADAS	SEM <sup>1</sup>	p
PI Día 6	2.68	2.50	0.104	0.130
RI Día 6	0.83	0.82	0.000	0.575
Relación PI/RI Día 6	3.24	3.06	0.106	0.202
PI Día 14	2.56	1.62	3.015	<0.001
RI Día 14	0.81	0.55	0.225	<0.001
Relación PI/RI Día 14	3.19	2.97	0.160	0.202

La tabla 12 muestra la comparación entre los grupos de vacías y preñadas, en las yeguas jóvenes, presentando las preñadas una mayor significación ( $p \leq 0,01$ ) en el PI y RI en el día 14 de medición, siendo estos menores en las gestantes.

Tabla 13. Estadísticos descriptivos de las yeguas maduras, evaluadas los días 6 y 14 post-ovulación (media  $\pm$  desviación estándar (DS); mínimo y máximo) teniendo en cuenta su estado de gestación.

YEGUAS MADURAS									
Variables	VACÍAS			PREÑADAS			TOTAL		
	Media $\pm$ SD	Min	Máx	Media $\pm$ SD	Min	Máx	Media $\pm$ SD	Min	Máx
PI Día 6	3.15 $\pm$ 0.29	2.67	3.67	2.87 $\pm$ 0.38	2.43	3.56	3.04 $\pm$ 0.34	2.43	3.67
RI Día 6	0.88 $\pm$ 0.26	0.85	0.93	0.90 $\pm$ 0.3	0.86	0.95	0.89 $\pm$ 0.2	0.85	0.95
Relación PI/RI Día 6	3.54 $\pm$ 0.31	3.03	3.98	3.19 $\pm$ 0.37	2.64	3.74	4.40 $\pm$ 0.37	2.64	3.98
PI Día 14	3.8 $\pm$ 0.28	2.68	3.65	2.12 $\pm$ 0.27	1.82	2.58	2.75 $\pm$ 0.60	1.82	3.65
RI Día 14	0.88 $\pm$ 0.02	0.86	0.92	0.70 $\pm$ 0.04	0.63	0.76	0.81 $\pm$ 0.09	0.63	0.92
Relación PI/RI Día 14	3.59 $\pm$ 0.29	3.05	3.97	3.04 $\pm$ 0.47	2.39	3.58	3.37 $\pm$ 0.45	2.39	3.97

Tabla 14. Media de mínimos cuadrados de los parámetros uterinos en el día 6 y 14 en yeguas maduras comparando los grupos vacías vs preñadas

YEGUAS MADURAS				
Variables	VACÍAS	PREÑADAS	SEM <sup>1</sup>	<i>p</i>
PI Día 6	3.15	2.87	0.270	0.142
RI Día 6	0.88	0.90	0.001	0.368
Relación PI/RI Día 6	3.54	3.19	0.451	0.069
PI Día 14	3.8	2.12	4.040	<0.001
RI Día 14	0.88	0.70	0.125	<0.001
Relación PI/RI Día 14	3.59	3.04	1.052	0.017

La tabla 14 muestra los resultados obtenidos en yeguas maduras al hacer una prueba ANOVA entre los grupos de yeguas vacías y preñadas. Como se puede apreciar, las preñadas presentan en el día 14 de medición una mayor significación ( $p \leq 0,01$ ) en el PI y RI, siendo estos menores en las gestantes. Al igual que se describió para las yeguas jóvenes en la tabla 12. Por consiguiente, tanto PI como RI disminuyen en las yeguas preñadas, ya sean jóvenes o maduras.

Tabla 15. Tabla Estadísticos descriptivos (media  $\pm$  desviación estándar (SD), mínimo (Min) y máximo (Max)) de los índices PI, RI y de la concentración plasmática de progesterona de yeguas vacías comparando yeguas jóvenes vs maduras (maduras vacías n=9; jóvenes vacías n=5).

YEGUAS VACÍAS MADURAS VS JÓVENES									
Variables	JÓVENES			MADURAS			TOTAL		
	Media $\pm$ SD	Min	Máx	Media $\pm$ SD	Min	Máx	Media $\pm$ SD	Min	Máx
PI Día 6	2.68 $\pm$ 0.16	2.43	2.90	3.15 $\pm$ 0.29	2.67	3.67	2.98 $\pm$ 0.34	2.43	3.67
RI Día 6	0.82 $\pm$ 0.3	0.79	0.86	0.88 $\pm$ 0.26	0.85	0.93	0.86 $\pm$ 0.39	0.79	0.93
Relación PI/RI Día 6	3.24 $\pm$ 0.24	2.83	3.45	3.54 $\pm$ 3.1	3.03	3.08	3.43 $\pm$ 0.31	2.83	3.98
PI Día 14	2.57 $\pm$ 0.37	1.95	2.85	3.18 $\pm$ 0.27	2.68	3.65	2.96 $\pm$ 0.42	1.95	3.65
RI Día 14	0.81 $\pm$ 0.13	0.57	0.88	0.88 $\pm$ 0.02	0.86	0.92	0.86 $\pm$ 0.08	0.57	0.92
Relación PI/RI Día 14	3.9 $\pm$ 0.21	2.83	3.42	3.59 $\pm$ 0.29	3.05	3.97	3.44 $\pm$ 0.32	2.83	3.97

Tabla 16. Media de mínimos cuadrados de los parámetros uterinos en el día +6 y +14 en yeguas vacías, comparando los grupos de jóvenes vs maduras.

YEGUAS VACÍAS				
Variables	JÓVENES	MADURAS	SEM <sup>1</sup>	p
PI Día 6	2.68	3.15	0.711	<0.05
RI Día 6	0.82	0.88	0.011	<0.05
Relación PI/RI Día 6	3.24	3.54	0.292	0.091
PI Día 14	2.57	3.18	1.204	<0.05
RI Día 14	0.81	0.88	0.019	0.112
Relación PI/RI Día 14	3.9	3.59	0.508	<0.05

La tabla 16 muestra la comparación mediante una ANOVA entre los grupos de jóvenes y maduras, en las yeguas vacías, presentando las maduras una mayor significación ( $p \leq 0,05$ ) en los índices uterinos (PI día 6, RI día 6, PI día 14) así como la relación PI/RI del día 14, sin embargo no se encontró ningún nivel de significación ni en la relación PI/RI día 6 ni RI día 14. A la vista de estos resultados, se obtiene que en las yeguas jóvenes el PI y RI es más bajo que en las maduras, sin influencia de la gestación.

Tabla 17. Estadísticos descriptivos de yeguas preñadas jóvenes vs maduras (media  $\pm$  desviación estándar (SD) de los índices PI, RI y de la concentración plasmática de progesterona de yeguas incluidas en esta investigación (maduras n=6; jóvenes n=10).

YEGUAS PREÑADAS MADURAS VS JÓVENES									
Variables	JOVENES			MADURAS			TOTAL		
	Media $\pm$ SD	Min	Máx	Media $\pm$ SD	Min	Máx	Media $\pm$ SD	Min	Máx
PI Día 6	2.50 $\pm$ 21	2.10	2.80	2.87 $\pm$ 0.38	2.43	3.56	2.64 $\pm$ 33	2.10	3.56
RI Día 6	0.81 $\pm$ 0.03	0.76	0.95	0.90 $\pm$ 0.3	0.86	0.95	0.84 $\pm$ 0.53	0.76	0.95
Relación PI/RI Día 6	3.06 $\pm$ 24	2.69	4.41	3.19 $\pm$ 0.37	2.64	3.74	3.11 $\pm$ 0.29	2.64	3.74
PI Día 14	1.62 $\pm$ 0.16	1.32	1.88	2.2 $\pm$ 0.26	1.82	2.58	1.80 $\pm$ 0.32	1.32	2.58
RI Día 14	0,55 $\pm$ 0.07	0.43	0.66	0,70 $\pm$ 0.04	0.63	0.76	0.61 $\pm$ 0.09	0.43	0.76
Relación PI/RI 14	2.97 $\pm$ 0.33	2.63	3.60	3.04 $\pm$ 0.47	2.39	3.58	2,9 $\pm$ 0.38	2.39	3.60

En el grupo de yeguas preñadas ambos índices son más bajos en jóvenes tanto en la primera medición realizada en el día +6 post-ovulación (PI:2.50 $\pm$ 21; RI:0.81 $\pm$ 0.03) que en maduras (PI:2.87 $\pm$ 0.38; RI:0.90 $\pm$ 0.3) como la llevada a cabo el día +14 post-ovulación y día en que se realizó el diagnóstico de gestación en jóvenes (PI:1.62 $\pm$ 0.16; RI:0.55 $\pm$ 0.07) que en maduras (PI:2.2 $\pm$  0.26; RI:0.70 $\pm$ 0.04).

Tabla 18. Media de mínimos cuadrados de los parámetros uterinos en el día +6 y +14 en yeguas preñadas, comparando los grupos de jóvenes vs maduras

YEGUAS PREÑADAS				
VARIABLES	JÓVENES	MADURAS	SEM <sup>1</sup>	p
PI Día 6	2.50	2.87	0.523	<0.05
RI Día 6	0.81	0.90	0.026	<0.001
Relación PI/RI Día 6	3.06	3.19	0.059	0.423
PI Día 14	1.62	2.2	0.949	<0.001
RI Día 14	0,55	0,70	0.084	<0.001
Relación PI/RI Día 14	2.97	3.04	0.022	0.712

La tabla 18 muestra la comparación mediante una ANOVA entre los grupos de jóvenes y maduras, en las yeguas preñadas, presentando las maduras una significación baja ( $p \leq 0,05$ ) en el PI día 6, sin embargo presentan un aumento muy significativo ( $p \leq 0,001$ ) de RI día 6, y PI y RI del día 14), con mayores valores en las maduras. Podemos decir que entre el total de preñadas, los índices en jóvenes son siempre más bajos que en maduras.

#### 5.4 Imágenes ecográficas.

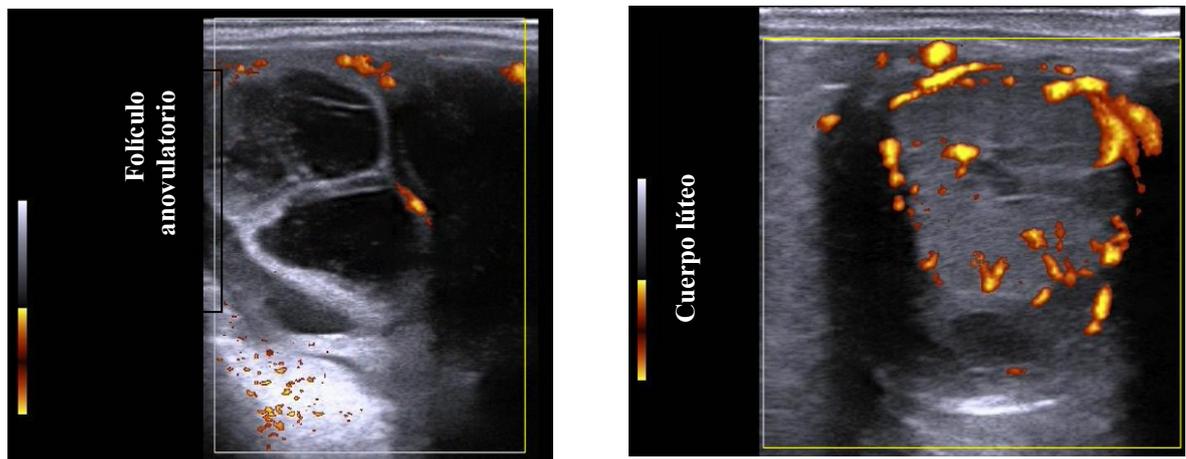


Fig. 6. Imágenes ecográficas de folículo anovulatorio y cuerpo lúteo.

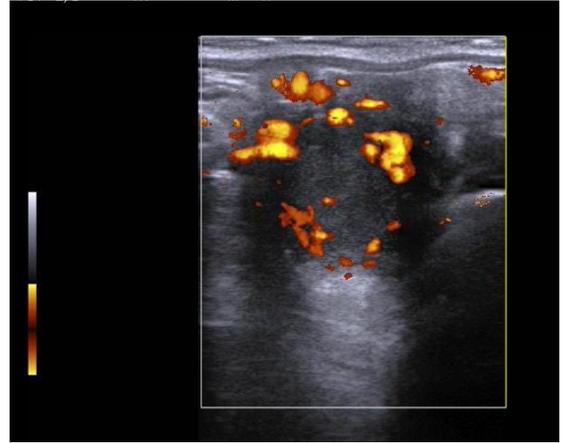
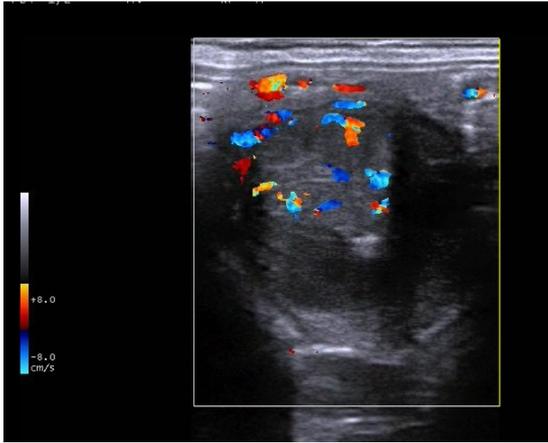


Fig. 7. El mismo cuerpo lúteo de una yegua joven evaluado con ultrasonografía Power Color (izquierda) y Power Doppler (derecha).

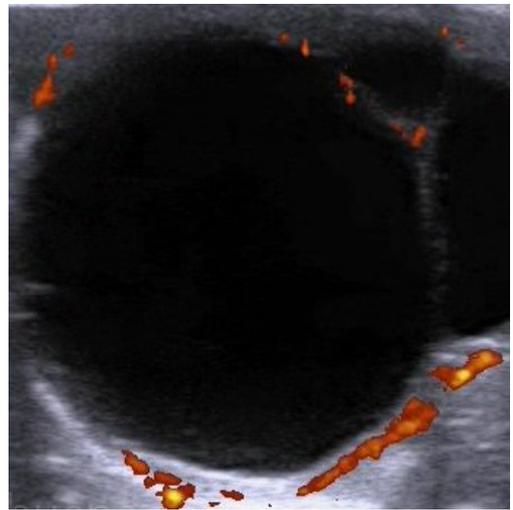
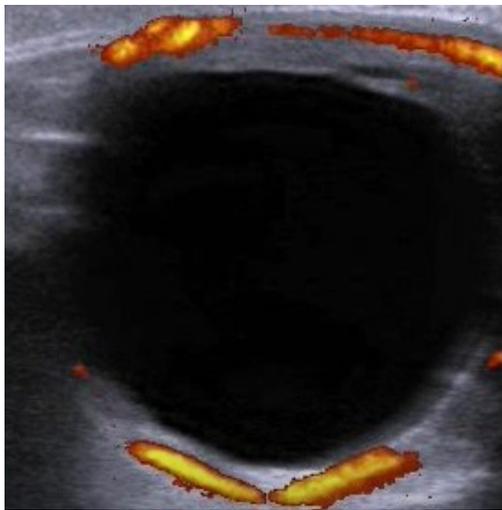


Fig. 8. Imágenes representativas de folículos preovulatorios obtenidas con ultrasonografía Power Doppler captadas en el momento de inducción a la ovulación. (izquierda) flujo sanguíneo folicular en yegua joven; (derecha) flujo sanguíneo folicular en yegua madura.

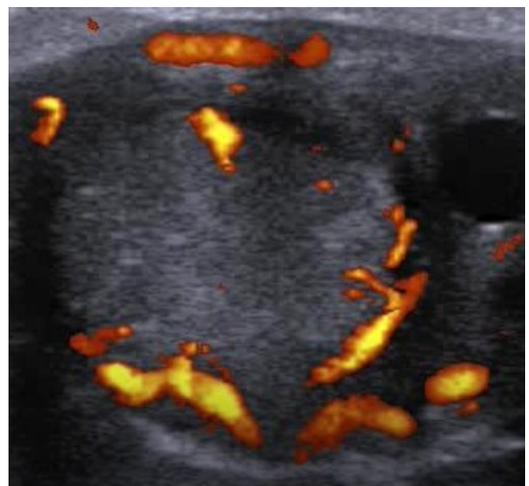
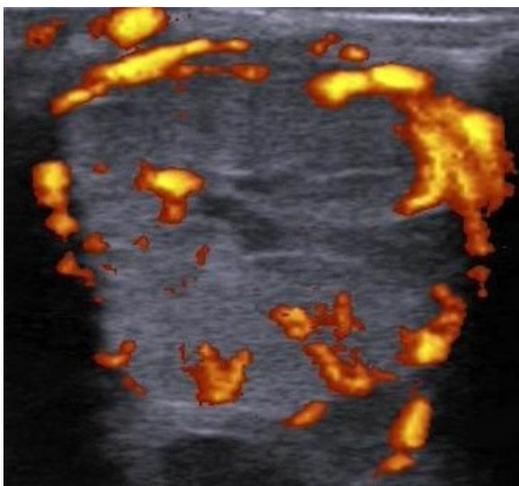


Fig. 9. Cuerpo lúteos activos 6 días después de la ovulación. (Izquierda) yegua joven; (derecha) yegua madura

---

## 6 DISCUSIÓN

En las yeguas es frecuente encontrar yeguas envejecidas por su valor genético y por su rendimiento, ya sea a nivel morfológico (belleza) o funcional (deportivo). El envejecimiento reproductivo de estos animales es un proceso fisiológico que afecta a su fertilidad. Por lo tanto, debe entenderse cómo cambian los parámetros reproductivos con la edad (Claes et al., 2017). La asociación entre el Power Doppler y la concentración de P4 a lo largo del ciclo estral de la yegua, podría permitir evaluar su capacidad reproductiva (Ginther et al., 2007d; Ferreira et al., 2001). El Power Doppler es una técnica no invasiva que permite la visualización de los órganos internos. Tiene la ventaja de no interrumpir las funciones fisiológicas reproductivas, tales como la gestación, carece de riesgo por exposición a la radiación de los rayos X y permite un uso frecuente, no solo en órganos reproductores aislados, sino también en el seguimiento de eventos reproductivos completos y hemodinámica ovárica (Echevarria, 2001; Brogan et al., 2016; Sales et al., 2021)

La evaluación del flujo sanguíneo folicular con el uso del Doppler color se ha utilizado en yeguas (Gastal et al., 2006a) como método para predecir la viabilidad folicular y la competencia del oocito. El flujo sanguíneo folicular se asocia con la madurez y calidad del oocito (Ginther et al., 2007b).

En esta investigación todas las imágenes tomadas de folículos preovulatorios se realizaron 24h después de la inducción de la ovulación (administración de hCG). Las yeguas de este estudio fueron inducidas a la ovulación con la misma dosis de hCG, la cual provoca un aumento instantáneo del flujo sanguíneo ovárico, pero no ejerce ningún efecto regulatorio en el riego sanguíneo tal y como demostró Castro (2016), con lo cual no interfiere en los cambios producidos en la perfusión sanguínea obtenidos.

El diámetro de los folículos preovulatorios encontrados en el estudio ecográfico varía entre los 38 y los 46 mm y se ha comprobado que el flujo sanguíneo folicular no está relacionado con el diámetro folicular en todas las yeguas. Esto puede deberse a que la vascularización alcanza su pico máximo a las 24 horas, sin que todavía haya alcanzado su máximo diámetro folicular. A medida, que transcurren las horas, el diámetro sigue aumentando pero el folículo sufre una abrupta disminución de la perfusión, las cuatro horas previas a la ovulación, como reseñó Gastal et al. (2006b), y que explicarían nuestros resultados.

La circulación sanguínea es fundamental para que CL mantenga sus propiedades funcionales (Bollwein et al., 2002). Después de la ovulación, la perfusión sanguínea del CL aumenta progresivamente hasta que involucra prácticamente toda el área al quinto día después de la ovulación. Basándonos en la investigación estos autores, nuestras mediciones se hicieron entre el 5º y 7º post-ovulación.

Según Brito (2017), la irrigación sanguínea de los folículos y del cuerpo lúteo aporta nutrientes, oxígeno, soporte hormonal y facilita la liberación de hormonas. Esto ha sido corroborado con nuestros resultados al haber obtenido una fuerte correlación positiva entre el flujo sanguíneo del cuerpo lúteo y los niveles de progesterona en plasma, secretada por el mismo.

En el presente estudio se comprobó que el flujo del CL está correlacionado con el área del CL de forma muy significativa en todas las yeguas analizadas, lo que está en consonancia con los datos de los autores Brogan et al. (2016) y Miró et al., (2015). Igualmente se comprobó que con el uso de la ecografía Doppler es posible determinar el potencial ovulatorio de folículos > 30 mm durante la estación reproductiva y prever el momento exacto de la ovulación, así como diferenciar CLs activos de inactivos. Con esta técnica se podría mejorar el perfeccionamiento del manejo reproductivo.

El Doppler color fue descrito como un medio de evaluación rápida de la función del CL, pues el área ocupada por el flujo sanguíneo de un CL está directamente correlacionada con la concentración P4 circulante, durante la fase lútea. La vascularización luteínica presenta una importancia relevante en la fisiología del CL (Ferreira-Dias et al., 2006), lo que concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación. En la práctica, la concentración de P4 plasmática se evalúa de forma

---

ocasional ya que implica un aumento de coste económico y se necesita tiempo para el análisis laboratorial, no siendo inmediata (Brogan et al., 2016, Miró et al., 2015).

La desaparición total de los vasos sanguíneos en un CL, detectado Doppler color, indica que el CL ya no es funcional con respecto a la secreción de progesterona. Sin embargo, aún se pueden detectar concentraciones de P4 en circulación o, en una fase final, la disminución más lenta durante la fase preluteínica (10-14 días después de la ovulación), que la disminución del aporte sanguíneo al CL (Ginther et al., 2007e). Estos resultados sugieren que el uso del Power Doppler, para determinar la perfusión sanguínea del CL es una técnica efectiva en la detección de fallos y de la regresión del CL antes de que cualquier disminución de P4 sea detectada en plasma o que se identifiquen alteraciones uterinas por ecografía en modo B (Brogan et al., 2016).

El Power Doppler nos permitió encontrar diferencias significativas en el flujo sanguíneo del folículo preovulatorio y del flujo sanguíneo del cuerpo lúteo entre yeguas jóvenes y maduras, 5-7 días, después ovulación en concordancia con Campos (2017). Nuestros resultados concuerdan con los de Bollwein et al. (2002), Ginther et al. (2007d y Alonso et al. (2019), quienes informaron de la máxima vascularización entre 6 días y 8 días después de la ovulación. Es bien sabido que la vascularización lútea es importante en el aporte de los nutrientes y sustratos necesarios para el óptimo funcionamiento y madurez del cuerpo lúteo (Ginther, 1992; Brito, 2017).

No se detectaron diferencias en cuanto al diámetro del folículo y el área CL de acuerdo con estudios previos (Alves et al., 2017; Gastal et al., 2020). De acuerdo con esos autores, la edad es un factor crítico que influye en la cantidad y calidad del folículo preantral equino.

Las concentraciones de P4 obtenidas denotaron que los cuerpos lúteos eran funcionales en todas las yeguas. Los niveles de P4 en plasma sanguíneo cuantificados en este estudio apoyan que el CL de las yeguas jóvenes, a partir del quinto día después de la ovulación, tenían la capacidad funcional para preservar la gestación hasta que la placenta asuma su función (Sales et al., 2021). Aunque las yeguas maduras tenían concentraciones de P4 más bajas que las más jóvenes, los valores eran más altos que el nivel plasmático mínimo (4 ng/ mL). Por tanto, no se esperaba un bajo rendimiento reproductivo en las yeguas maduras de esta investigación (Marinone et al., 2017). Una vez más, la causa

fisiológica de las diferencias significativas en la concentración plasmática de P4 entre yeguas maduras y jóvenes se podría relacionar con cambios en las características de los ciclos reproductivos (Carnevale, 2008).

El envejecimiento en las yeguas afecta al desarrollo del folículo dominante. Además, se han reportado previamente concentraciones más altas de progesterona plasmática postovulatoria en yeguas jóvenes frente a las envejecidas (Vanderwall et al., 1993; Fonda et al., 1988). Aunque utilizamos el tratamiento con hCG para la inducción de la ovulación, no establecimos la correlación entre ese tratamiento y las concentraciones de progesterona. Un estudio realizado por Alonso et al. (2019) sugirió que el tratamiento con hCG no aumentaba las concentraciones de progesterona.

En el presente estudio, se encontró que el flujo sanguíneo del cuerpo lúteo es un predictor moderadamente bueno de niveles de progesterona. Estos resultados apoyarían el interés en Power Doppler como un método no invasivo, técnica para cuantificar los niveles plasmáticos de progesterona en yeguas cíclicas. Es más, se ha encontrado que los niveles de flujo sanguíneo del cuerpo lúteo (FSCL) y progesterona en yeguas están correlacionados positivamente, concordando con las investigaciones previas de Bollwein et al. (2002) e Ishak et al. (2017).

Utilizando los datos presentados por Ishak et al. (2017), en la ecuación 1, los niveles plasmáticos de progesterona serían subestimados en un 21% por FSCL, lo que sugiere que este tipo de predicción necesita refinamiento.

Sales et al. (2021) encontró que la ecografía Doppler se correlaciona con la concentración de progesterona y el día de transferencia de embriones en yeguas Mangalarga Marchador, lo que indica que la ecografía Doppler podría ser una herramienta importante en la selección del embrión apropiado yeguas receptoras en Pura Raza Española.

La evaluación de los índices PI y RI proporcionan información de la vascularización de la arteria uterina con la ventaja de que son buenos indicadores de la perfusión vascular en el útero y no se ven afectados por el ángulo Doppler (Bollewin et al., 1998; Sharma et al., 2019). PI y RI son inversamente proporcionales a la perfusión

de los tejidos adyacentes donde se localizan los vasos sanguíneos (Silva et al., 2006; Bollwein et al., 2016).

En este estudio, los valores obtenidos de RI para todas las yeguas evaluadas están en el mismo rango de los descritos por Bollewin et al 1998 y Turna et al., 2014. La alta correlación positiva que se encontró entre los índices PI y RI confirman los resultados descritos por Ginther y Utt (2004) y Costa Ferreira et al., (2020). La similitud de PI y RI en la primera medición en los dos grupos de edad (jóvenes y maduras) podría estar respaldada por la ausencia de cambios patológicos graves en la vasculatura endometrial y glandular de las yeguas maduras (Ousey et al., 2011).

Al igual que describieron Ferreira et al. (2011), se ha detectado que ambos índices disminuyeron en yeguas preñadas. Sin embargo, son menores en el grupo de yeguas preñadas jóvenes vs maduras tanto al realizar la primera medición ecográfica (Día +6) como en la realizada el Día +14. Está demostrado que durante la primera mitad de la gestación equina la vasculatura del útero grávido se transforma de vasos de alta resistencia con bajo flujo, a vasos de baja resistencia con alto flujo sanguíneo, y el momento de esta transición se correlaciona estrechamente con el inicio de la angiogénesis placentaria. En la gestación humana se produce una disminución similar del RI de la arteria uterina al final del primer trimestre, a medida que las arterias espirales invaden los lechos vasculares útero-placentarios (Dickey 1997; Kingdom et al. 2000; Whitley y Cartwright 2010).

Parece ser que cuando las yeguas están preñadas, los valores de PI y RI desciende de forma más rápida en el grupo de jóvenes que en el de maduras, pudiendo estar este hecho relacionado con la degeneración del endometrio equino que se presenta con la edad y que puede contribuir a una mala perfusión uterina (Ousey et al., 2011; Turna et al, 2014).

Teniendo en cuenta la edad, la primera medición realizada en el día D+6 post-ovulación demostró un incremento del índice PI en yeguas vacías maduras lo que indica una disminución del ritmo de perfusión al tejido (Amso et al., 2001; Ginther and Matthew, 2004). Sin embargo, a Día +14 se apreció que las yeguas jóvenes preñadas presentaron una disminución de los índices PI y RI y, por tanto, hubo un aumento de la perfusión vascular lo que coincide con los resultados de Ferreria et al., (2010), que valoraron los

mismos índices en los primeros 20 días de gestación. Apreciaron que a medida que avanzaba la gestación había una disminución progresiva de RI y PI. Esta alteración de la hemodinámica uterina puede ser útil para el diagnóstico precoz de gestación, pudiendo iniciar un lavado sabiendo que hay altas posibilidades de encontrar un embrión, ya que podemos predecir de forma temprana la gestación, así como para determinar el momento ideal para la recolección de embriones con vistas a la criopreservación (Ferreira y Meira, 2011).

## 7 CONCLUSIONES

PRIMERA: El Power Doppler tiene un enorme potencial para evaluar la hemodinámica ovárica y utilizada en conjunto con la ecografía convencional (modo B) podrá contribuir al perfeccionamiento del manejo reproductivo equino diario, al ser muy útil para evaluar la funcionalidad del cuerpo lúteo, obteniendo mejor aprovechamiento del material genético y mejorando los rendimientos reproductivos.

SEGUNDA: Los niveles plasmáticos de progesterona se pueden predecir a partir del flujo sanguíneo del cuerpo lúteo utilizando la técnica ecográfica de Power Doppler, aplicando rectas de regresión, y reduciendo el coste económico de la medición de esta hormona laboratorialmente.

TERCERA Nuestros resultados apoyan que la edad es un factor que influye significativamente en la perfusión sanguínea folicular y del cuerpo lúteo así como la concentración plasmática de progesterona en yeguas. Se necesitan más estudios para mejorar la precisión y exactitud de tales predicciones

CUARTA: Los índices PI/RI obtenidos mediante Doppler pulsado se pueden utilizar como predictor prematuro de la gestación, éstos son siempre más bajos en yeguas jóvenes, y bajan significativamente en las yeguas gestantes, pudiéndose aplicar a la obtención de embriones para su transferencia y/o recolección para su criopreservación.



## 8 RESUMEN

**Introducción:** Esta tesis doctoral ha sido desarrollada gracias al contrato mediante artículo 83 formalizado entre la Yeguada Miguel A. de Cárdenas (Écija, Sevilla) y los directores de esta tesis doctoral del grupo de investigación AGR-019 “Fisiovet” de la Universidad de Córdoba. La yegua es un animal poliéstrico estacional en la que los procesos reproductivos se ven afectados por cambios estacionales en el fotoperiodo, siendo su ciclo de días largos, es decir en primavera-verano cuando ocurre el pico de la función ovárica. La ovulación de las yeguas se produce a intervalos de 21 días aproximadamente, durante la época reproductiva, 24 o 48 horas antes del final del estro. El final del estro, se ve reflejado en un aumento en los niveles de progesterona (P4), la cual es secretada por el cuerpo lúteo (CL). El control reproductivo en las yeguas y la predicción de la funcionalidad ovárica son de suma importancia para el éxito de una ganadería equina. Con la técnica ecográfica modo B, podemos monitorizar la dinámica folicular, así como la ovulación y la posterior área y ecogenicidad del cuerpo lúteo. En reproducción equina, es importante conocer con precisión el momento de la ovulación, para que el depósito del semen se realice lo más cerca posible del momento de la liberación del ovocito, así como la funcionalidad del cuerpo lúteo para evitar reabsorciones de la vesícula embrionaria por falta de secreción de progesterona. La ultrasonografía Power Doppler es una técnica que ha demostrado tener un potencial añadido que permite mejorar las capacidades de diagnóstico al ser una técnica no invasiva, que permite evaluar flujo sanguíneo y vascularización de un órgano objetivo. Para realizar un estudio en profundidad del ovario, una herramienta útil para evaluar la actividad del CL es la determinación de la concentración de P4. En consecuencia, la relación de la FSCL con la concentración de progesterona podrían ser un modelo predictivo para estimar la funcionalidad de la CL evitando situaciones de estrés para los animales, proporcionando un buen pronóstico y mejorando el cuidado de las yeguas y su gestión práctica. La ultrasonografía Power Doppler podría contribuir a la mejora de la gestión reproductiva de los equinos, consiguiendo un mejor aprovechamiento del material genético y aumentando el rendimiento económico.

**Objetivos:** El objetivo general de esta investigación fue utilizar la técnica ultrasonográfica power-doppler para la funcionalidad ovárica, así mismo como predictor temprano de gestación en la yegua Pura Raza Española para que pueda ser de aplicada en la práctica clínica de reproducción equina. Objetivos específicos: *Primero:* Determinar mediante ultrasonografía modo B medidas morfométricas (diámetro-área) y mediante power-doppler el flujo hemodinámico de los folículos preovulatorios y de la funcionalidad del posterior cuerpo lúteo que formen en distintos grupos de edad. *Segundo:* Evaluar la influencia de la edad en parámetros ultrasonográficos (diámetro folicular, flujo sanguíneo folicular, área del cuerpo lúteo y flujo sanguíneo del cuerpo lúteo) y las concentraciones de progesterona. *Tercero:* Caracterización de la perfusión vascular uterina a través de los índices de pulsatibilidad y resistencia como predictores tempranos de gestación.

**Hipótesis:** Para ello nos planteamos como hipótesis que las estructuras ováricas como folículos preovulatorios y cuerpos lúteos deben de tener una perfusión sanguínea adecuada para su fisiología endocrina al secretar hormonas. Si medimos con una técnica no invasiva como la ecografía doppler el riego sanguíneo de la mismas, aparte de su diámetros y áreas, y analizamos las hormonas en plasma mediante un ensayo por inmuno absorción ligado a enzimas, conocido como ELISA, podremos establecer una ecuación de regresión que permita predecir la concentración hormonal únicamente con una ecografía ovárica. Así mismo, la medición de los índices de pulsatibilidad y resistencia uterinos deben de variar tanto con la edad como con la gestación, y se podrían emplear como predictores tempranos de gestación.

**Metodología:** En la metodología de nuestro trabajo se evaluaron 30 yeguas de Pura Raza Española con un rango de edad entre 4 y 19 años (con un promedio de 9,3) y un peso que osciló entre los 600 y 700 kg, con una condición corporal mínima de 8. Todas las yeguas tenían un tracto reproductivo normal, una duración típica de los ciclos estrales, estaban libres de enfermedades infecciosas y se alojaron en establos con acceso ad libitum al agua, heno y sal mineral. Las yeguas, con el fin de poder valorar el efecto de la edad, se dividieron en dos grupos: jóvenes (<8 años, n = 15) y maduras (>8 años, n = 15). La fase experimental se llevó a cabo en la ganadería “Miguel Ángel de Cárdenas”, ubicada en la Finca San Pablo (Écija, Sevilla, España). El manejo se hizo siguiendo los requisitos exigidos por la Universidad de Córdoba sobre bienestar y experimentación animal.

Todas las yeguas de este estudio se sometieron a un examen clínico general y ginecológico previo para descartar posibles patologías reproductivas y determinar el momento del ciclo en el que se encontraban. Mediante ecografía se comprobó que estuvieran en celo con un folículo preovulatorio de 35 mm de diámetro o superior, así como edema endometrial, y mediante palpación rectal se comprobó que tuvieran tono cervical. Posteriormente se les administró vía intravenosa una dosis de 3000 UI de hCG (VETERIN CORION®) para la inducción de la ovulación. En todas ellas, la ovulación se registró entre las 24 y las 48 h posteriores a la administración de la hCG mediante ecografía. La inseminación artificial se realizó con semen refrigerado obtenido de sementales de la propia yeguada.

Se realizó un examen minucioso y en profundidad de los ovarios y el útero de cada una de las yeguas para conseguir una interpretación correcta de la dinámica folicular. Las imágenes power doppler grabadas se tomaron de yeguas con folículos preovulatorios de 35 mm que coincidían con la administración de hCG (inducción de la ovulación). Se asumió el tiempo de ovulación entre 24 y 48 h después de la administración de hCG. El examen ecográfico del CL fue realizado entre los 5-6 días post-ovulación y se obtuvieron muestras de sangre para el análisis de progesterona. Junto con el examen de ambos ovarios, también se registraron imágenes del útero para un análisis más completo de la perfusión vascular uterina. Se llevó a cabo la medición de los índices PI/RI de la arteria uterina, con el registro de al menos dos ciclos cardíacos consecutivos. Así mismo se realizó el diagnóstico de gestación y la medición de los índices PI/RI de la arteria uterina de nuevo a los 14 días.

Se realizó un estudio estadístico de los resultados obtenidos, obteniendo los estadísticos básicos de las mediciones realizadas, análisis de varianza y grado de significación, además de correlaciones entre los mismos.

**Resultados:** Para los parámetros: diámetro de folículo preovulatorio (mm), flujo sanguíneo del folículo preovulatorio (%), área del cuerpo lúteo (mm), flujo sanguíneo del cuerpo lúteo (%), y progesterona (ng/mL) fueron mayores en las jóvenes que en las maduras. Con respecto a la edad se apreciaron correlaciones positivas ( $p \leq 0.05$ ) con el flujo sanguíneo del folículo preovulatorio; así mismo, se encontraron correlaciones negativas ( $p \leq 0,05$ ) para el diámetro del folículo preovulatorio y el flujo sanguíneo del cuerpo lúteo y una fuerte correlación negativa ( $p \leq 0,01$ ) con la progesterona. El flujo sanguíneo del cuerpo lúteo presenta correlaciones muy significativas y positivas ( $p$

$\leq 0,01$ ) con el área del cuerpo lúteo y la concentración de progesterona. Sin embargo, esta correlación es negativa a medida que aumenta la edad (mayores de 8 años). En todas las yeguas incluidas en este estudio no existe correlación significativa del flujo sanguíneo del folículo preovulatorio, ni del diámetro del folículo preovulatorio ni tampoco del área del cuerpo lúteo con las demás variables analizadas. En el presente estudio, se encontró que el flujo sanguíneo del cuerpo lúteo es un predictor moderadamente bueno de niveles de progesterona. Estos resultados apoyarían el interés en Power Doppler como un método no invasivo, técnica para cuantificar los niveles plasmáticos de progesterona en yeguas cíclicas, mediante la recta de regresión lineal propuesta a partir del flujo sanguíneo del cuerpo lúteo. Se obtuvo que para las yeguas jóvenes el PI y RI fueron más bajos que en las maduras, sin influencia de la gestación. En las yeguas preñadas, los valores de PI y RI desciende de forma más rápida en el grupo de jóvenes que en el de maduras, apreciándose que a medida que avanzaba la gestación había una disminución progresiva de PI y RI.

**Conclusiones:** Las conclusiones obtenidas en la presente tesis doctoral fueron las siguientes: *Primera:* El Power Doppler tiene un enorme potencial para evaluar la hemodinámica ovárica y utilizada en conjunto con la ecografía convencional (modo B) podrá contribuir al perfeccionamiento del manejo reproductivo equino diario, al ser muy útil para evaluar la funcionalidad del cuerpo lúteo, obteniendo mejor aprovechamiento del material genético y mejorando los rendimientos reproductivos. *Segunda:* Los niveles plasmáticos de progesterona se pueden predecir a partir del flujo sanguíneo del cuerpo lúteo utilizando la técnica ecográfica de Power Doppler, aplicando rectas de regresión, y reduciendo el coste económico de la medición de esta hormona laboratorialmente. *Tercera:* Nuestros resultados apoyan que la edad es un factor que influye significativamente en la perfusión sanguínea folicular y del cuerpo lúteo así como la concentración plasmática de progesterona en yeguas. Se necesitan más estudios para mejorar la precisión y exactitud de tales predicciones. *Cuarta:* Los índices PI/RI obtenidos mediante Doppler pulsado se pueden utilizar como predictor prematuro de la gestación, éstos son siempre más bajos en yeguas jóvenes, y bajan significativamente en las yeguas gestantes, pudiéndose aplicar a la obtención de embriones para su transferencia y/o recolección para su criopreservación.

**PALABRAS CLAVE:** Equino; progesterona; hemodinámica; cuerpo lúteo; índices uterinos; ecografía.

## 9 ABSTRACT

**Introduction:** This investigation has been developed thanks to the contract by means of article 83 formalized between Miguel A. de Cárdenas Stud Farm (Écija, Seville) and the directors of this doctoral thesis belong to the research group AGR-019 "Fisiovet" of the University of Cordoba. The mare is a seasonal polyestrous animal in which the reproductive processes are affected by seasonal changes in the photoperiod, being its cycle of long days, i.e. in spring-summer when the peak of the ovarian function occurs. Ovulation in mares occurs at approximately 21-day intervals during the breeding season, 24 to 48 hours before the end of oestrus. The end of oestrus is reflected in increased levels of progesterone (P4), which is secreted by the corpus luteum (CL). Reproductive monitoring in mares and the prediction of ovarian functionality are of utmost importance for the success of an equine farm. With the B-mode ultrasound technique, we can monitor follicular dynamics as well as ovulation and subsequent corpus luteum area and echogenicity. In equine reproduction, it is important to precisely know the moment of ovulation, so that the semen is deposited as close as possible to the moment of oocyte release, as well as the functionality of the corpus luteum to avoid reabsorption of the embryonic vesicle due to lack of progesterone secretion. Power Doppler ultrasonography is a technique that has been shown to have an added potential to improve diagnostic capabilities as it is a non-invasive technique that allows blood flow and vascularization of a target organ to be assessed. For an in-depth study of the ovary, a useful tool to assess the activity of the LC is the determination of P4 concentration. Consequently, the relationship of FSCL with progesterone concentration could be a predictive model to estimate the functionality of the CL avoiding stressful situations for the animals, providing a good prognosis and improving the mares' care and practical management. Power Doppler ultrasonography could contribute to the improvement of equine reproductive management, achieving a better use of genetic material and increasing economic performance.

**Objectives:** The general objective of this research was to use the power-doppler ultrasonographic technique for ovarian functionality, as well as an early predictor of gestation in the Pura Raza Española mare so that it can be applied in the clinical practice of equine reproduction. Specific objectives: *First:* To determine by B-mode ultrasonography morphometric measurements (diameter-area) and by power-Doppler the haemodynamic flow of the pre-ovulatory follicles and the functionality of the subsequent corpus luteum that they form in different age groups. *Second:* To evaluate the influence of age on ultrasonographic parameters (follicular diameter, follicular blood flow, corpus luteum area and corpus luteum blood flow) and progesterone concentrations. *Third:* Characterization of uterine vascular perfusion through pulsation and resistance indices as early predictors of gestation.

**Hypothesis:** We hypothesize that ovarian structures such as pre-ovulatory follicles and corpora lutea must have adequate blood perfusion for their endocrine physiology when secreting hormones. If we measure with a non-invasive technique such as Doppler ultrasound the blood supply of these structures, apart from their diameters and areas, and analyses the hormones in plasma using an enzyme-linked immunosorbent assay, known as ELISA, we can establish a regression equation that allows us to predict the hormone concentration only with an ovarian ultrasound, and the measurement of the uterine pulsation and resistance indices should vary with both age and gestation, and could be used as early predictors of gestation.

**Methodology:** In the methodology of our work, 30 Pura Raza Española mares were evaluated with an age range between 4 and 19 years (with an average of 9.3) and a weight ranging between 600 and 700 kg, with a minimum body condition of 8. All mares had a normal reproductive tract, a typical length of oestrous cycles, were free of infectious diseases and were housed in stables with ab libitum access to water, hay and mineral salt. The mares, in order to be able to assess the effect of age, were divided into two groups: young (<8 years, n = 15) and mature (>8 years, n = 15). The experimental phase was carried out at the "Miguel Ángel de Cárdenas" livestock farm, located at Finca San Pablo (Écija, Seville, Spain). The management was done following the requirements of the University of Cordoba on animal welfare and experimentation.

All the mares in this study underwent a general clinical and gynaecological examination beforehand to rule out possible reproductive pathologies and to determine the time of their cycle. Ultrasonography was used to check that they were in oestrus with

a pre-ovulatory follicle of 35 mm in diameter or greater, as well as endometrial oedema, and rectal palpation was used to check that they had cervical tone. Subsequently, a dose of 3000 IU of hCG (VETERIN CORION®) was administered intravenously to induce ovulation. In all of them, ovulation was recorded between 24 and 48 h after hCG administration by ultrasound. Artificial insemination was performed with refrigerated semen obtained from the stud's own stallions.

A thorough and in-depth examination of the ovaries and uterus of each of the mares was performed to obtain a correct interpretation of the follicular dynamics. The recorded power doppler images were taken from mares with pre-ovulatory follicles of 35 mm coinciding with the administration of hCG (ovulation induction). Ovulation time was assumed to be between 24 and 48 h after hCG administration. Ultrasound examination of the CL was performed 5-6 days post-ovulation and blood samples were obtained for progesterone analysis. Along with the examination of both ovaries, images of the uterus were also recorded for a more complete analysis of uterine vascular perfusion. Measurement of the PI/RI indices of the uterine artery was performed, with recording of at least two consecutive cardiac cycles. Diagnosis of gestation and measurement of the PI/RI indices of the uterine artery was performed again after 14 days.

A statistical study of the results obtained was carried out, obtaining the basic statistics of the measurements taken, analysis of variance and degree of significance, as well as correlations between them.

**Results:** For the parameters: preovulatory follicle diameter (mm), preovulatory follicle blood flow (%), corpus luteum area (mm), corpus luteum blood flow (%), and progesterone (ng/mL) were higher in young women than in mature women. With respect to age, positive correlations ( $p \leq 0.05$ ) were found with pre-ovulatory follicle blood flow; negative correlations ( $p \leq 0.05$ ) were found for pre-ovulatory follicle diameter and corpus luteum blood flow and a strong negative correlation ( $p \leq 0.01$ ) with progesterone. Corpus luteum blood flow has highly significant and positive correlations ( $p \leq 0.01$ ) with corpus luteum area and progesterone concentration. However, this correlation becomes negative with increasing age (older than 8 years). In all mares included in this study, there is no significant correlation of pre-ovulatory follicle blood flow, pre-ovulatory follicle diameter and corpus luteum area with the other variables analyzed. In the present study, corpus luteum blood flow was found to be a moderately good predictor of progesterone levels. These results would support the interest in Power Doppler as a non-invasive

method, technique to quantify plasma progesterone levels in cyclic mares, using the proposed linear regression line from corpus luteum blood flow. It was obtained that for young mares the PI and RI were lower than in mature mares, without influence of gestation. In pregnant mares, PI and RI values fell more rapidly in the young group than in the mature group, with a progressive decrease in PI and RI as gestation progressed.

**Conclusions:** The conclusions obtained in the present doctoral thesis were as follows: First: Power Doppler has an enormous potential to evaluate ovarian haemodynamics and used in conjunction with conventional ultrasound (B-mode) could contribute to the improvement of daily equine reproductive management, as it is very useful to evaluate the functionality of the corpus luteum, obtaining better use of genetic material and improving reproductive performances. Second: Plasma progesterone levels can be predicted from corpus luteum blood flow using the Power Doppler ultrasound technique, applying regression lines, and reducing the economic cost of measuring this hormone laboratorially. Third: Our results support that age is a significant factor influencing follicular and corpus luteum blood perfusion and plasma progesterone concentration in mares. Further studies are needed to improve the precision and accuracy of such predictions. Fourth: PI/RI indices obtained by pulsed Doppler can be used as an early predictor of gestation, they are always lower in young mares, and drop significantly in pregnant mares, and can be applied to embryo procurement for transfer and/or collection for cryopreservation.

**KEYWORDS:** Equine; progesterone; haemodynamics; corpus luteum; uterine indexes; ultrasound.

---

## 10 BIBIOGRAFÍA

- Acosta T.J., Yoshizawa N., Ohtani M., Miyamoto A. (2002). Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  injection in the cow. *Biol Reprod*, 66, 651-658.
- Acosta T.J., Gastal E.L., Gastal M.O., Beg M.A., Ginther O.J. (2004a). Differential blood flow changes between the future dominant and subordinate follicles precede diameter changes during follicle selection in mares. *Biol. Reprod.*, 71, 502-507.
- Acosta T.J., Beg MA, Ginther OJ. (2004b). Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant sized transitional anovulatory follicles in mares. *Biol Reprod*, 71:637-642.
- Acosta T.J., Miyamoto (2004). Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim. Reprod. Sci*, 82, 127-140.
- Al-zi'abi M., Fraser H., Watson E. (2002). Cell death during natural and induced luteal regression in mares. *Reproduction*, 123, 67-77.
- Al-zi'abi M., Watson E., Fraser, H. (2003). Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. *Reproduction*, 125, 259-270.
- Alonso M.A., Silva L.A., Affonso F.J., Lemes K.M., Celeghini E.C.C., Lan P Boni, R., Carvalho H.F., de Arruda R.P. (2019). Effect of hCG application at different moments of the estrous cycle on corpus luteum and uterine vascularization and serum progesterone concentration in mares. *Anim Reprod*, 24, 317–327.
- Altermatt J.L., Marolf A.J., Wrigley R.H., Carnevale E.M. (2012). Effects of FSH and LH on ovarian and follicular blood flow, follicular growth and oocyte developmental competence in young and old mares. *Anim. Reprod. Sci.*, 133, 191-197.
- Alves K.A., Alves B.G., Gastal G.D.A., Haag, K.T., Gastal M.O., Figueiredo J.R., Gambarini M.L., Gastal E.L. (2017). Preantral follicle density in ovarian biopsy fragments and effects of mare age. *Reprod. Fertil. Dev.*, 29, 867-875.
- Amso, N., Watermeyer, S., O'Brien D., D'Angelo, A. (2001). Quantification of power Doppler energy and its future potential. *Fertility and Sterility*, 76, 583–587.
- Armstrong D., Webb R. (1997). Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev Reprod*, 3, 139-146.

- Arthur, G.H. 1975 Veterinary reproduction, and obstetrics. Fourth edition. London: Baillière-Tindall. pp, 616.
- Asa C.S., Goldfoot D.A., García M.C., Ginther O.J. (1980). Sexual behavior in ovariectomized and seasonally anovulatory mares (*Equus caballus*). *Horm Behav*, 14, 46-54.
- Asa C.S., Goldfoot D.A., Ginther O.J. (1983). Assessment of the sexual behaviour of pregnant mares. *Horm Behav*, 38, 1-13.
- Atayde L., Rocha A. (2011). Selected Ovarian Ultrasonographic Characteristics During Vernal Transition are Useful to Estimate Time of First Ovulation of the Year: Transitional Mares. *Reprod. Domest. Anim.*, 46, 240–246.
- Aurich, C. (2011). Reproductive cycles of horses. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 220-228.
- Bashir S.T., Ishak G.M., Gastal M.O., Roser J.F., Gastal E.L. (2016). Changes in intrafollicular concentrations of free IGF-1, activin A, inhibin A, VEGF, estradiol, and prolactin before ovulation in mares. *Theriogenology*, 85(8), 1491–1498.
- Baucus K.L., Squires E.L., Morris R., McKinnon A.O. (1987). The effect of stage of gestation and frequency of prostaglandin injection on induction of abortion in mares. Communication. Proceedings of the 10th Equine Nutrition and Physiology Symposium. Colorado State University, 11-13 June 1987.
- Benloucif S., Guico M.J., Rei K.J., Wolfe L.F., L’Hermite-Balériaux, M., Zee P.C. (2005). Stability of melatonin and temperature as circadian phase markers and their relation to sleep times in humans. *J Biol Rhythms*, 20, 178-188.
- Berisha B., Schams D., Kosmann M., Amselgruber R. (2000). Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. *Biol Reprod*, 63, 1106-1114.
- Bikfalvi A., Savona C., Perollet C., Javerzat S. (1998). New insights in the biology of fibroblast growth factor-2. *Angiogenesis*, 1, 155–173.
- Bollwein H., Maierl J., Mayer R., Stolla R. (1998). Transrectal color doppler sonography of the uterine artery in cyclic mares. *Theriogenology*, 49, 1483-1488.
- Bollwein H., Weber F., Kolberg B., Stolla R. (2002a). Uterine and ovarian blood flow during estrous cycle in mares. *Theriogenology*, 57, 2129-2138.
- Bollwein H., Mayer R., Weber F., Stolla R. (2002). Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*, 57(8), 2043-2051.
- Bollwein H., Mayer R., Stolla R. (2003). Transrectal doppler sonography of uterine blood flow during early pregnancy in mares. *Theriogenology*, 60, 597-605.
- Bollwein H., Heppelmann M., Lüttgenau J. (2016) Ultrasonographic Doppler Use for Female Reproduction Management. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, Volume 32, 1:149 – 164

- 
- Bowman M.C. (2006). Utilizing body temperature to evaluate ovulation in mature mares. College Station, TX: Texas A&M.
- Brinsko S.P., Blanchard T.L., Varner D.D., Schumacher, J., Love, C.C. (2010). Manual of equine reproduction, 2<sup>nd</sup> ed, Elsevier Health Sciences.
- Brito L.F.C., Baldrighi J.M., Wolf C.A., Ginther O.J. (2017). Effect of GnRH and hCG on progesterone concentrations and ovarian and luteal blood flow in diestrous mares. *Anim. Reprod. Sci.* 176, 64-69
- Brogan P.T., Henninga H., Stoutabc T.A.E. de Ruijter-Villania M. (2016) Relationship between colour flow Doppler sonographic assessment of corpus luteum activity and progesterone concentrations in mares after embryo transfer. *Anim. Reprod. Sci.* 166, 22-27.
- Bude R., Rubin J. (1996). Power Doppler sonography. *Radiology*, 200, 21-23.
- Camillo D., Pacini M., Panzani D. Vannozzi I., Rota A., Aria G. (2004). Clinical use of twice daily injections of buserelin acetate to induce ovulation in the mares. *Vet. Res. Commun.*, 28, 169-172.
- Campos, M.J.A.P.M. (2017). Utilização de doppler na avaliação hemodinâmica ovárica de éguas pura raça espanhola\_ estudio piloto. Dissertação do Maestrado Integrado en Medicina Veterinaria. Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Carnevale E., Checura C., Coutinho da Silva M., Gregg P., Pierson R. (2002). Use of computer-assisted image analysis to determine the interval before and after ovulation. American Association of Equine Practitioner Proceedings, 48, 48–50.
- Carnevale E.M. (2008). The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. *Theriogenology*, 61, 23–30.
- Carnevale E.M., Olsen L.M. (2011). Normal anatomy. Equine Reproduction, 2<sup>nd</sup> edition. Mckinnon A.O., Squires E.L., Wendy E.V., Varner D.D., Wiley-Blackwell. 2003-2008.
- Carvalho C.F., Chammasii M.C., Cerriii G.G. (2008). Principios físicos do Doppler em ultrasonografia. *Ciência Rural*, 38, 872-879.
- Carrillo-Vico A., Reiter R. J., Lardone P. J., Herrera J. L., Fernández-Montesinos R., Guerrero, J. M., et al. (2006). The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 7(5), 423.
- Castro T., Oliveira F.A., Siddiquim M.A., Baldrighi J.M., Wolf C.A., Ginther, O.J. (2016). Stimulation of LH, FSH and luteal blood flow by GnRH during the luteal phase in mares. *Theriogenology* 85, 740-746.
- Cheruca C.M., Beg M.A., Parrish J.J., Ginther O.J. (2010). Functional relationships among intrafollicular insulin-like growth factor 1, circulatory gonadotropins, and development of the dominant follicle in mares. *Anim. Reprod. Sci.*, 118(2-4), 270-278.

- Claes A., Ball B.A., Scoggin K.E., Roser J.F., Woodward E.M., Davolli G.M., Squires, E.L.; Troedsson, M.H.T. The influence of age, antral follicle count and diestrus ovulations on estrous cycle characteristics of mares. *Theriogenology*, 2017, 15, 34-40.
- Cleaver B.D., Grubaugh W.R., Davis S.D., Sheerin P.C., Franklin K.J., Sharp D.C (1991). Effect of constant light exposure on circulating gonadotrophin levels and hypothalamic gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) content in the ovariectomized pony mare. *J Reprod Fertil Suppl*, 44, 259e66.
- Cortés-Vidauri Z., Aréchiga-Flores C., Rincón-Delgado M., Rochín-Berumen F., López C.M., Flores-Flores G. (2018). Revisión: El ciclo reproductivo de la yegua. *Abanico Veterinario*. 8(3):14-41. ISSN: 2448-6132.
- Costa Ferreira C.S, Lima Moarais R.C., Pereira de Andrade A.B., Balara M.A., Silva, J.A., Mendes, G., Pinna A.E. (2020). Spectral Doppler ultrasound in selecting an equine embryo receiver.
- Crowell-Davis S.L. (2007). Sexual behaviour of mares. *Horm. Behav* 52, 12-17.
- Cuervo-Arango J., Newcombe J.R. (2008). Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern on two consecutive cycles in the mare and how they are influenced by ovulation inductors. *Theriogenology*, 69, 681-687.
- Cuervo-Arango J., Newcombe J.R. (2010). Cloprostenol in equine reproductive practice: something more than a luteolytic drug. *Reprod. Domest. Anim.*, 45 (5): e 8-11.
- Derar D., Taya K., Watanabe G., Miyake Y.I. (2011). Characterization of Immunoreactive IGF-I Pattern During the Peri-ovulatory Period of the Oestrous Cycle of Thoroughbred Mares and Its Relation to Other Hormones. *Reprod. Domest. Anim.* 47(1), 151-156.
- Dickey, R.P. (1997) Doppler ultrasound investigation of uterine and ovarian blood flow in infertility and early pregnancy. *Human Reprod. Update* 3, 467- 503.
- Dickson S., Fraser H. (2000). Inhibition of early luteal angiogenesis by gonadotropin releasing hormone antagonist treatment in the primate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 2339–2344.
- Dollez R., Ruzickova K., Maceckova G. (2012). Growth of the dominant follicle and endometrial folding after administration of hCG in mares during oestrus. *Veterinarni Medicina*. 57(1): 36-41.
- Donadeux F.X., Watson E.D. (2007). Seasonal changes in ovarian activity: lessons learnt from the horses. *Anim. Reprod. Sci.* 100, 225-242.
- Donadeux, F. X., Pedersen H. G. (2008). Follicle development in mares. *Reprod. Domest. Anim.*, 43, 224-231.
- Dufour P., Courtois J., Seynaeve Y., Peeters S., Le Goff C., Cavalier E., Ponthier J. (2021). Development and validation of a liquid chromatography coupled to mass spectrometer (LC-MS) method for the simultaneous quantification of estrone-3-sulfate, progesterone,

- estrone and estradiol in serum of mares and American bisons. *Res. Vet. Sci.*, 136, 343–350.
- Dvorkin A.M., Cardinali P.D. (2005). *Bases Fisiológicas de la Práctica Médica*. 13ª. Editorial Médica Panamericana. México.
- Ebling F.J.P. (2015). Hypothalamic control of seasonal changes in food intake and body weight. *Front Neuroendocrinol*, 37,97–107.
- Ebling F.J.P., Lincoln G.A. Wollnik F., Anderson N. (1988). Effects of constant darkness and constant light on circadian organization and reproductive responses in the ram. *J Biol Rhythms*, 3, 365-384.
- Echevarria, L. (2001). La ecografía como técnica. *Rev. Investig. Vet. Perú*, 12, 2.
- Esposito L., Salzano A., Russo M., de Nicola D., Prandi A., Gasparri B., Campanile G., Neglia G. (2020). Corpus Luteum Color Doppler Ultrasound and Pregnancy Outcome in Buffalo during the Transitional Period. *Animals (Basel)*. 13;10(7), 1181.
- Fernanda A., Mello D., Gustavo L., Gonçalves G. (2012). The season effects on testosterone (T4) and semen parameters of Quarter Horse stallions in Southern Brazil. *Rev Científica Eletrônica Med Veterinaria*, 9, 1e14.
- Ferreira-Dias G., Pinto Bravo P., Mateus L., Redmer D.A., Medeiros J.A. (2006.) Microvascularization and angiogenic activity of equine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Domest. Anim. Endocrinol*, 30:247-259.
- Ferreira-Dias G., Costa A., Mateus L., Korzekwa A., Redmer D., Skarzynski D. (2006). Proliferative processes within the equine corpus luteum may depend on paracrine progesterone actions. *J. Physiol. Pharmacol.*, 57, supp. 8, 139-151.
- Ferreira J.C., Gastal E.L., Ginther O.J. (2008). Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of size of the cystic area and age. *Reproduction*, 135, 541-550.
- Ferreira J.C., et al. Uterine vascular perfusion and spectral Doppler measurements during the early gestation in mares: new concepts of evaluation. In: *International Symposium on Equine Reproduction 10.*, 2010, Lexington, KY, USA. *Proceedings...* Lexington:Elsevier, 2010. V.1. p.281
- Ferreira, J.C., Ignacio F.S., Meira, C.D. (2001). Doppler ultrasonography principles and methods of evaluation of the reproductive tract in mares. *Acta Sci. Vet.* 2001, 39, 105-111.
- Ferreira, J.C., Ignacio, F.S. Meira C. (2011). Doppler ultrasonography principles and methods of evaluation of the reproductive tract in mares. *Acta Sci. Vet.* 39 (1), 105-111.
- Ferreira J.C., Meira, C. (2011) Aplicação da ultrassonografia colorida Doppler em programas de transferência de embriões equinos. *Ciencia Rural* 41(6), 1063-1069
- Ferreira J.C. (2013). Avaliação ultrassonográfica Doppler pré e pós-cobertura do trato reprodutivo de éguas. *Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte*, 37(2), 108-114.

- Ferreira J.C., Ignacio, F.S., Rocha, N.S., Thompson Jr., D.J., Pinto, C.R., Meira, C. (2015). Real-time characterization of the uterine blood flow in mares before and after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 160, 90-96.
- Folkman J., Klagsburn M. (1991), Angiogenic factors. *Science*, 235, 442–447.
- Fonda E.S., Hackett G.E., Burrill, M.J., Cogger, E.A. (1988). A comparison of LH and progesterone secretion in young and aged mares. *J. Anim. Sci.*, 1, 429.
- Fowden A., Forhead A, Ousey J. (2008). The Endocrinology of Equine Parturition. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 116, 393-403.
- Freeman D.A., Woods G.L., Vanderwall D.K., Weber J.A. (1992) Embryo-initiated oviductal transport in mares. *J Reprod Fertil*, 75, 535-38.
- García-Sacristán, A. (2018). Fisiología Veterinaria, Ed. Tébar-Flores, Madrid, España.
- Gastal M.O., Gastal E.L., Ginther O.J. (1998). The suitability of echotexture characteristics of the follicular wall for identifying the optimal breeding day in mares. *Theriogenology*, 50, 1025-1038.
- Gastal M.O., Gastal, E.L., Ginther, O.J. (2006a). Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to change in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Reproduction*, 131, 699-709.
- Gastal E.L., Gastal M.O., Ginther, O.J. (2006b). Serrated granulosa and at her discrete ultrasound indicators of impending ovulation in mares. *Theriogenology* 50, 1025-1038.
- Gastal M.O., Gastal. E.L., Ginther, O.J. (2006c). Effects of hCG on characteristics of the wall of the developing preovulatory follicle evaluated by B-mode and color-Doppler ultrasonography and interrelationships with systemic estradiol concentration in mares. *Anim Reprod. Sci.* 94, 186-190.
- Gastal, E., Gastal, M. (2012). Clinical use of B-mode and color-Doppler ultrasonography to evaluate preovulatory follicle status in mares, 359–369. Carbondale: IVIS. Retrieved from [www.ivis.org](http://www.ivis.org)
- Gastal E.I., Aguiar F.L.N., Gastal, G.D.A., Alves K.A., Alves B.G., Figueiredo J.R. (2020) Harvesting, processing, and evaluation of in vitro-manipulated equine preantral follicles: A review. *Therigenology*, 156, 283–295.
- Gentry L.R., Thompson D.L., Gentry G.T., Davis K.A., Godke, R.A. (2002). High versus low body condition in mares: Interactions with responses to somatotropin, GnRH analog, and dexamethasone. *J Anim Sci* 80, 77-85.
- Ginther O.J. (1988). Ultrasonic imaging of equine ovarian follicles and corpora lutea. *Vet Clin North Am Equine Pract* 4, 197-213.
- Ginther O.J. (1992). Reproductive Biology of the Mare: basic and applied aspects, 2nd edition.

---

ed.; Equines service Publishing: Cross Plains, WI, USA

- Ginther O.J., Beg M.A., Donaux F.X., Bergfelt D.R. (2003). Mechanism of follicle deviation in monovular farm. *Anim Reprod Sci* 15, 78(3-4):239-57.
- Ginther O., Be, M., Gastal M., Gastal, E. (2004a). Follicle dynamics and selection in mares. *Anim. Reprod.*, 1, 45-63.
- Ginther O.J., Matthew D. (2004). Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potencial. *J. Equine Vet Sci*, 24(12) 516-526.
- Ginther O.J., Utt M.D. (2004). Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques and potencial. *J. Equine Vet Sci*. 24, 516-526
- Ginther O.J. (2007). Producing color-flow images. In *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Colo-Doppler Ultrasonography*, 39-60. Ed. OJ Publishing, USA.
- Ginther O.J. (2008). Characterization of pulses of 13, 14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2</sub>alpha (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during and after luteolysis in mares. *Reprod. Fertil. Dev.*, 20, 684-693.
- Ginther O.J., Gastal E.L., Gastal M.O., Beg M.A. (2008) Dynamics of the Equine Preovulatory Follicle and Periovarian Hormones: What's New? *J Equine Vet Sci.*, 28, (8), 454-460.
- Ginther O.J. (2014). How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. *Theriogenology*, 81, 112-125
- Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Beg, M.A. (2007a). Incidence, endocrinology, vascularity and morphology of hemorrhagic anovulatory follicles in mares. *J. Eq. Vet. Sci.* 27, 130-139.
- Ginther O.J., Gastal E.L., Gastal M.O. (2007b). Spatial relationships between serrated granulosa and vascularity of the preovulatory follicle and developing corpus luteum. *J Equine Vet Sci.*, 27, 20-27.
- Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Siddiqui, M.A., Beg, M.A. (2007c). Relationships of follicle versus oocyte maturity to ultrasound morphology, blood flow and hormone concentrations of the preovulatory follicle in mare. *Biolog. Reprod.* 77, 2-208.
- Ginther O.J., Gastal E.L., Gastal M.O., Beg M.A. (2007d). Effect of prostaglandine F<sub>2</sub> alfa on ovarian, adrenal, and pituitary hormones and on luteal blood flow in mares. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2007, 32, 315-328.
- Ginther O.J., Gastal E.L., Gastal M.O., Utt, M.D., Beg, M.A. (2007e). Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 99, 213-220.
- Goede V., Schmidt T., Kimmina S. (1998). Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Laboratory Investigation*, 78, 1385-1394.

- Gospodarowicz D., Cheng J., Lui G. (1985). Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. *Endocrinology*, 117, 2383-2389.
- Grasseli F., Bassi G., Bussolati S., Tamanini C. (2002). Effects of VEGF and bFGF on Proliferation and Production of Steroids and Nitric Oxide in Porcine Granulosa Cells. *Reprod Dom Anim*, 37, 362-368.
- Guerin MV, Wang XJ. (1994). Environmental temperature has an influence on timing of the first ovulation of seasonal estrus in the mare. *Theriogenology*, 4, 053e60.
- Guerin M.V., Deed R.D., Kennaway, D.J., Matthews C.D. (1995). Plasma melatonin in the horse: measurements in natural photoperiod and in acutely extended darkness throughout the year. *J Pineal Res.*, 19, 7-15.
- Haluska G.J., Lowe J.E., Currie W.B. (1987). Electromyographic properties of the myometrium correlated with the endocrinology of the pre-partum and post-partum periods and parturition in pony mares. *J Reprod Fertil Suppl*, 35:553-64.
- Heidler B., Aurich J.E., Pohl W., Aurich C. (2004). Body weight of mares and foals, estrous cycles and plasma glucose concentration in lactating and non-lactating Lipizzaner mares. *Theriogenology*, 61, 883-93.
- Henneke D.R., Potter G.D., Kreider J.L., Yeates, B.F. (1983). Relationship between condition score, physical measurements, and body fat percentage in mares. *Equine Vet. J.*, 15, 371-372.
- Ishak G.M., Bashir S.T., Gastal M.O., Gastal E.L. (2017) Pre-ovulatory follicle affects corpus luteum diameter, blood flow, and progesterone production in mares. *Anim. Reprod. Sci.*, 187, 1-12,
- Järvelä I.Y., Sladkevicius P., Kelly, S., Ojha, K., Nargund, G., Campbell S. (2002). Three dimensional sonographic and power Doppler characterization of ovaries in late follicular phase. *Ultrasound Obstet Gynecol.*, 20(3), 281-5.
- Jeffcott L.B., Rossdale P.D. (1977) A critical review of current methods for induction of parturition in the mare. *Equine Vet J.* 9 (4), 208-15.
- Kingdom, J., Huppertz, B., Seawood, G. and Kaufmann, P. (2000) Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 92, 35-43.
- Kirkpatrick J.F., Vail R., Devous S., Schwend S., Baker C.B., Wiesner L. (1976). Diurnal variation of plasma testosterone in wild stallions. *Biol Reprod.*, 15: 98e101.
- Klerman E.B., Gershengorn H.B., Duffy J.F., Kronauer R.E. (2002). Comparisons of the variability of three markers of the human circadian pacemaker. *J Biol Rhythms*, 17, 181-193.
- Lee T., Avraham H., Lee S., Avraham S. (2002). Vascular endothelial growth factor modulates neutrophil transendothelial migration via upregulation of interleukin-8 in human brain microvascular endothelial cells. *J. Biol. Chem*, 22, 10445-10 451.

- 
- Lewy A.J., Sack R.L. (1989). The dim light melatonin onset as a marker for orcadian phase position. *Chronobiol Int*, 6, 93-102.
- Lincoln G.A. (2006) Melatonin entrainment of circannual rhythms. *Chronobiol. Int.*, 23 (1-2), 301-306.
- Malpoux B., Migaud M., Tricoire H., Chemineau P. (2001). Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms*, 16, 336e47.
- Marinone A.I., Mucci N., Kaiser G., Losinno, L., Armendano, J., Rodríguez E. Mutto A., Redolatti C., Cantatore S., Herrera M.F., et al. (2017) Reproductive Characteristics in old and young subfertile mares: Are they really different? *J. Equine Vet. Sci.* 55, 90-96.
- Martin A.M., Elliott J.A., Duffy P., Blake C.M., Ben Attia S., Katz L.M. et al. (2010). Circadian regulation of locomotor activity and skeletal muscle gene expression in the horse. *J Appl Physiol*, 109, 1328-1336.
- Maywood E.S., Hastings M.H., Max M., Ampleford Menaker, E.M., Loudon A.S.I. (1993). Circadian and daily rhythms of melatonin in the blood and pineal gland of free-running and entrained Syrian hamsters. *J Endocrinol*, 136, 65-73.
- McCracken J.A., Carlson J.C., Glew M.C., Goding J.R., Baird D.T., Green K., et al. (1972). Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  identified as a luteolytic hormone in the sheep. *Nature*, 238, 129-34.
- McKinnon A., Squires E., Vaala W., Varner D. (2011). Equine Reproduction. Journal of Chemical Information and Modeling (2nd ed., Vol. 1). United Kingdom: Wiley-Blackwell.
- Miró J., Muñoz F., Piedrafita J., Quintero A. (2004). Prediction of the day of ovulation in mares through physiological parameters mesearud during estrous. *Revista Científica FCV UJZ*, 14, 54-58.
- Miró J., Vilés, K., Anglada O., Marín H., Jordana J., Crisci A. (2015). Color Doppler provides a reliable and rapid means of monitoring luteolysis in female donkeys. *Theriogenology*, 83, 485-490.
- Morgan P.J., Webster C.A., Mercer J.G., Ross, A.W., Hazlerigg D.G., MacLean A., et al. (1996). The ovine pars tuberalis secretes a factor(s) that regulates gene expression in both lactotropic and nonlactotropic pituitary cells. *Endocrinology*, 137(9), 4018-4026.
- Murphy B.A., Vick M.M., Sessions D.R., Cook R.F., Fitzgerald B.P. (2006). Evidence of an oscillating peripheral clock in an equine fibroblast cell line and adipose tissue but not in peripheral blood. *J Comp Physiol A*, 192, 743-751.
- Murphy B.A., Elliott J.A., Sessions D.R., Vick M.M. Kennedy E.L. Fitzgerald B.P. (2007). Rapid phase adjustment of melatonin and core body temperature rhythms following a 6-h advance of the light/dark cycle in the horse. *J Circadian Rhythms*, 5, 5.

- Murphy B.A., Martin A.M., Furney P., Elliott J.A (2011). Absence of a serum melatonin rhythm under acutely extended darkness in the horse. *J Circadian Rhythms*, 9, 3.
- Murphy B.A. (2019). Circadian and Circannual Regulation in the Horse: Internal Timing in an Elite Athlete. *J. Equine Vet. Sci.*, 76, 14-24.
- Neuvians T., Schams D., Berisha B., Pfaffl M. (2004). Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F<sub>2α</sub>-induced luteolysis in bovine corpus luteum. *Biol. Reprod.*, 70, 473-480.
- Niswender G.D., Juengel J.L., Silva P.J., Rollyson M.K., McIntush E.W. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev.* 80, 1-29.
- Orden APA/3319/2002, de 23 de diciembre por la que se establecen las normas zootécnicas del caballo Pura Raza Español. BOE-A-2002-25418.
- Ousey, J.C., Kölling, M., Newton R., Wright M., Allen W.R. (2012). *Uterine haemodynamics in young and aged pregnant mares measured using Doppler ultrasonography*, 44(Supplement s41), 15–21. doi:10.1111/j.2042-3306.2011.00446.x.
- Pashen R., Allen W. (1979) The role of the fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 27, 499-509.
- Pedrosa R., Tavares M., Ferreira L., Alves V., Costa A., Ribeiro A., de Figueiredo R. (2011). Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana. *Acta Vet Bras.*, 5(2), 147-57.
- Piccione G., Caola G. Refinetti R. (2002a) The circadian rhythm of body temperature of the horse. *Biol. Res.*, 33, 113-119.
- Piccione G., Caola G., Refinetti R. (2002b). Maturation of the daily body temperature rhythm in sheep and horse. *J Therm Biol.*, 27, 333e6.
- Piccione, G. Caola, G. Refinetti R. (2005). Temporal relationships of 21 physiological variables in horse and sheep. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 142, 389-396.
- Pierson R., Ginther O. (1985). Ultrasonic evaluation of the corpus luteum of the mare. *Theriogenology*, 23 (5), 95- 806.
- Redmer D., Doraiswamy V., Bortnem B., Fisher K., Jablonka-Shariff A., Grazul-Bilska, A., Reynolds L. (2001). Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol. Reprod.*, 65, 879-889.
- Reece O. (2015). *Dukes Physiology of Domestic Animals*. 13th Edition. Wiley- Blackwell.
- Reef R. (1998). *Physics and instrumentation* in Reef, Virginia (1998) “Equine Diagnostic Ultrasound”, 1st ed, Elsevier, 1-22.

- 
- Reiter, R. J., Tan, D.-x., Terron, M. P., Flores, L. J., & Czarnocki, Z. (2007). Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochimica Polonica -English Edition*, 54(1), 1
- Reppert S.M., Perlow M.J., Tamarkin L., Orloff D., Klein D.C (1981). The effects of environmental lighting on the daily melatonin rhythm in primate cerebrospinal fluid. *Brain Res*, 223, 313-323.
- Requena, F.; Campos, M.J.; Martínez Marín, A.L.; Camacho, R.; Giráldez-Pérez, R.M.; Agüera, E.I. (2021). Assessment of Age Effects on Ovarian Hemodynamics Using Doppler Ultrasound and Progesterone Concentrations in Cycling Spanish Purebred Mares. *Animals*, 11, 2339.
- Reynolds L., Redmer D. (1998). Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J. Anim. Sci.*, 76, 1671-1681.
- Robinson N.E., Sprayberry K.A. (2009). *Current therapy in equine medicine*. Elsevier Health Sciences.
- Roizen J., Luedke C.E., Herzog E.D., Muglia L.J. (2007). Oxytocin in the circadian timing of birth. *PLoS One*, 2, e922
- Rossdale P.D., Short R. V. (1967). Foaling of thoroughbred mares. *J Reprod Fert.* 13:341-3.
- Rubens D., Bhatt S., Nedelka S., Cullinan J. (2006). Doppler Artifacts and Pitfalls, *Radiologic Clinics of North America*, 44, 805-835.
- Salazar-Ortiz J., Camous S., Briant C., Lardic L., Chesneau D., Guillaume D. (2011). Effects of nutritional cues on the duration of the winter anovulatory phase and on associated hormone levels in adult female Welsh pony horses (*Equus caballus*). *Reprod Biol Endocrinol*, 9, 130.
- Sales F.A.B.M., Azevedo M.V., Souza, N.M., Ferreira-Silva, J.C., Chaves, M.S., Junior, V.R., Rocha J.M., Dos Santos Filho J.P., Freitas V.J.F., Oliveira M.A.L. (2021). Correlations of corpus luteum blood flow with fertility and progesterone in embryo recipient mares. *Trop Anim. Health Prod.* 22, 280.
- Samper J.C., Pycock J.F. (2007). The normal uterus in estrus. In: Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO (eds) *Current Therapy in Equine Reproduction*. St Louis, MO: Saunders Elsevier, 32-35.
- Samper J.C. 2008. Induction of estrus and ovulation. Why some mares respond and other do not. *Theriogenology*, 70, 445-447
- Sellix M.T., Yoshikawa T., Menaker M. A (2010). Circadian egg timer gates ovulation. *Curr Biol*, 20, R266e7.
- Senger, P.L. (2013) *Pathways to pregnancy and parturition*. 3<sup>rd</sup> edition Current Conceptions, Inc., Redmon, Oregon USA.

- Sharma M., Hollerbach S., Fusaroli P., Löwe A., Koch J., Ignee A., Jenssen C., Dietrich C. (2019). General principles of imagen optimizarion in EUS. *Endosc Ultrasound*, 10 (3), 168-184.
- Silva L.A. (2005). Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. *Biol. Reprod.* 72, 755-761.
- Silva L.A, Ginther O.J. 2006. An early vascular indicator of completed orientation of the embryo and the role of dorsal endometrial encroachment in mares. *Biol Reprod*, 74, 337-343.
- Silva Gomes T. (2008). Equine corpus luteum vascular evaluation by power-doppler ultrasound. Dissertation of the integrated master in veterinary medicine. Universidade Técnica de Lisboa, Lisbon, Portugal.
- Silver M. (1990). Prenatal maturation, the timing of birth and how it may be regulated in domestic animals. *Experimental physiology*, 75(3), 285-307.
- Silverthorn D.U. (2019). Fisiología humana. Un enfoque integrado. [En línea]. Johnson, B.R., Ober, W.C., Ober, C.E., Impaglizzo, A. y Silverthorn, A.C. 8º edición. Editorial Médica Panamericana.
- Son G.H., Chung S., Choe H.K., Kim H.D., Baik S.M., Lee H., et al. (2008). Adrenal peripheral clock controls the autonomous circadian rhythm of glucocorticoid by causing rhythmic steroid production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 20970e5.
- Squires E., McKinnon A., Shideler R. (1988). Use of ultrasonography in reproductive management of mares. *Theriogenology*, 29, 55-70.
- Squires E.L. (2008). Hormonal manipulation of the mare: a review. *J.Equine Vet. Sci.* 28, 627-634
- Staempfli S.A. (2011). Prostaglandins. In: *Equine Reproduction 2<sup>nd</sup> edition* Mckinnon, A.O., Squires, E.L., Wendy, E.V., Varner, D.D., Wiley-Blackwell. 1797-1803.
- Stout T. (2011). Prostaglandins. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (eds), *Equine reproduction*, 2nd ed. Iowa, Willey-Blackwell.
- Tamanini C., Basini G., Grasseli F., Tirelli M. (2003). Nitric oxide and the ovary. *J Anim Sci.*, 81, E1-7.
- Tamanini C., Ambrogi M. (2004) Angiogenesis in Developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim.*, 39, 206-216.
- Townson, D.H., Ginther, O.J. (1987). Duration and pattern of follicular evacuation during ovulation in the mare. *Anim Reprod Sci.*, 15, 31-38.
- Townson D., Pierson R., Ginther O. (1989). Characterization of plasma progesterone concentrations for two distinct luteal morphologies in mares. *Theriogenology*, 32, 2, 197-204.

- Troedsson M.H.T. (1999). Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*, 52(3), 461-471.
- Turna O., Gunduz M., Evkuran, G., Kurvan I., Ergengin O., Ucmak M. (2014) Is uterine blood flow influenced by hCG and mare ages?. *Animal Reprod Sci.*, 151, 182-185.
- Vanderwall D.K., Woods, G.L., Freeman D.A.; Weber J.A., Rock R.W., Tester, D.F (1993). Ovarian follicles, ovulations and progesterone concentrations in aged versus young mares. *Theriogenology*, 40, 21–32.
- Vanderwall D.K. (2011). Early embryonic loss. *Equine Reproduction* 2nd edition Mckinnon, A.O., Squires, E.L., Wendy, E.V., Varner, D.D., Wiley-Blackwell. 2119-2122.
- Vecchio D., Neglia G., Gasparrini B., Russo M., Pacelli, C., Prandi, A., D’Occhio, M.J., Campanile G. (2012). Corpus luteum development and function and relationship to pregnancy during the breeding season in the Mediterranean buffalo. *Theriogenology*, 77, 1811–1815.
- Watson E.D., Thomassen R., Nikolakopoulos, E. (2002). Association of uterine edema with follicle waves around the onset of the breeding season in pony mares. *Theriogenology*, 59, 1-7.
- Watts L.M., Browne J.A., Murphy B.A. (2012). Investigation of a non-invasive method of assessing the equine circadian clock using hair follicle cells. *J Circadian Rhythms*, 10, 7.
- Webb R., Woad K., Armstrong D. (2002). Corpus luteum (CL) function local control mechanisms. *Domest Anim Endocrinol*, 23, 277-285.
- Weems C.W., Weems Y.S., Randel R.D. (2006). Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Vet J.*, 171 (2), 206-28.
- Wespi B., Sieme H., Wedekind C., Burger D. (2014). Exposure to stallion accelerates the onset of mares’ cyclicity. *Theriogenology*, 82:189e94.
- Witherspoon D.M., Talbot R.B. (1970). Nocturnal ovulation in the equine animal. *Vet Rec.*, 87, 02e4.
- Witte R.S., John S. (2017). *Statistics* (11<sup>a</sup> ed). Wiley.
- Whitley, G.S. and Cartwright, J.E. (2010) Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. *Placenta* 31, 465-474.
- Wood S., Loudon A. (2014). Clocks for all seasons: unwinding the roles and mechanisms of circadian and interval timers in the hypothalamus and pituitary. *J Endocrinol*, 222: R39–59.
- Yoshikawa T., Sellix M., Pezuk P., Menaker M. (2009). Timing of the ovarian circadian clock is regulated by gonadotropins. *Endocrinology*, 150, 4338e47.

Yoshimura T. (2013). Thyroid hormone and seasonal regulation of reproduction. *Front Neuroendocrinol.* 34:157–66.

## **11 ANEXO I. INDICIO DE CALIDAD**

## Article

# Assessment of Age Effects on Ovarian Hemodynamics Using Doppler Ultrasound and Progesterone Concentrations in Cycling Spanish Purebred Mares

Francisco Requena <sup>1</sup>, María Joana A. P. M. Campos <sup>2</sup>, Andrés Luis Martínez Marín <sup>2</sup>, Rocío Camacho <sup>1</sup>, Rosa M. Giráldez-Pérez <sup>1</sup> and Estrella I. Agüera <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, Ctra. Madrid-Cádiz km 396, 14071 Córdoba, Spain; v02redof@uco.es (F.R.); m92caagr@uco.es (R.C.); rgiraldez@uco.es (R.M.G.-P.)

<sup>2</sup> Departamento de Producción Animal, Universidad de Córdoba, Ctra. Madrid-Cádiz km 396, 14071 Córdoba, Spain; z72macaj@uco.es (M.J.A.P.M.C.); pa1martm@uco.es (A.L.M.M.)

\* Correspondence: ba1agbue@uco.es



**Citation:** Requena, F.; Campos, M.J.A.P.M.; Martínez Marín, A.L.; Camacho, R.; Giráldez-Pérez, R.M.; Agüera, E.I. Assessment of Age Effects on Ovarian Hemodynamics Using Doppler Ultrasound and Progesterone Concentrations in Cycling Spanish Purebred Mares. *Animals* **2021**, *11*, 2339. <https://doi.org/10.3390/ani11082339>

Academic Editor: Ramón Arias

Received: 30 June 2021

Accepted: 6 August 2021

Published: 8 August 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** Power Doppler is a non-invasive imaging technique that allows complete monitoring of the ovary changes in cycling mares. We use Power Doppler to investigate differences in follicular diameter and corpus luteum area as well as in follicular and corpus luteum blood flows between young and mature Spanish Purebred mares. Young mares had higher follicular and corpus luteum blood flows as well as higher blood progesterone levels. Moreover, we found that blood progesterone levels could be predicted in both groups from corpus luteum blood flow with moderate precision and accuracy. These results support the usefulness of Power Doppler to monitor ovarian hemodynamics and the suitability of corpus luteum blood flow to estimate blood progesterone levels in cycling mares.

**Abstract:** In equine reproduction, accurate and timely detection of the moment of ovulation is of great importance. Power Doppler ultrasound technology is a non-invasive method that enables to assess the morpho-echogenic features and blood flow changes during the estral cycle in mares. The objective of the present study was to evaluate the influence of age on ultrasonographic parameters (follicular diameter, follicular blood flow—FBF, corpus luteum (CL) area and corpus luteum blood flow—CLBF) and blood plasma progesterone concentrations in cycling Spanish Purebred mares (15 less than 8 years old and 15 equal or higher than 8 years old). The ultrasound images obtained were analyzed with the Image Colour Summarizer software, which allows the quantification of the pixels of each image. Young mares had significantly higher FBF, CLBF and plasma progesterone levels. Moreover, linear regression analysis showed that blood progesterone levels could be predicted in both groups from CLBF with moderate precision and accuracy. In conclusion, Power Doppler was useful to assess ovarian hemodynamics. Our results support that age is a factor that significantly influences FBF and CLBF as well as blood progesterone concentration in mares. More studies would be needed to develop high precision and accuracy predictive models of blood progesterone concentration from CLBF measured by Power Doppler.

**Keywords:** Spanish purebred; power doppler; reproduction

## 1. Introduction

In equine reproduction, accurate and timely detection of the moment of ovulation is of great importance for the following reasons: (i) to ensure that ovulation occurred within the estimated time period after pre-ovulation; (ii) to establish the number of ovulations in relation to the number of pre-existing follicles, to be able to carry out the appropriate management in cases of twins, and (iii) to ensure the rupture and collapse of the follicle,

followed by the release of the oocyte, thus allowing to detect possible cases of anovulatory follicles [1]. There is an increased permeability of blood vessels and an intense angiogenesis in the ovary during follicular development, ovulation, and subsequent corpus luteum (CL) formation.

Power Doppler ultrasound has the advantage of being a non-invasive method that enables to assess not only the morpho-echogenic features but also physiological events during the estral cycle such as the vascularization and blood flow (arterial and venous) of ovaries [2]. Measurement of follicle and CL blood flow (CLBF) can be achieved by this technique during the right-hander and also after the administration of hormonal treatments [3], which allows a deeper understanding of the reproductive pathophysiology of a mare. To make an in-depth study of the ovary, a useful tool to evaluate CL activity is to determine the blood concentration of progesterone [4]. Accordingly, any relationship between blood progesterone concentration and CLBF could be a predictive model to estimate the functionality of CL [5] avoiding stressful situations for animals [6] and providing a good prognosis and improving mare care and their practice management [7]. Power Doppler could contribute to the enhancement of equine reproductive management, achieving better use of genetic material and increasing financial return [8].

The Spanish Purebred is the most representative autochthonous equine breed in Spain. It has experienced a great boom in recent years and is widespread worldwide, so it is essential to guarantee its preservation by the Spanish State, as guarantor of a genetic heritage that cannot suffer any deterioration, avoiding possible risks of the dispersion of criteria that could compromise its adequate conservation [9]. A qualified breeding mare is three or more years old and meets the basic aptitude for reproduction, according to the established criteria referring to the breed prototype or morphology, functional test and examination of the reproductive system and veterinary control [9].

The objective of the present study was to evaluate the influence of age on ultrasonographic parameters (follicular diameter, follicular blood flow (FBF), CL area and CLBF) and blood plasma progesterone concentrations.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

Cycling Spanish Purebred mares ( $n = 30$ ; 600–700 kg), with a range of age between 4 and 19 years (average 9.3 years) were evaluated. The animals maintained a high body condition score (score  $\geq 8$ ) during the experiment [10]. All mares had normal reproductive tract, typical oestrus cycles length and were free from infectious diseases. All mares were housed in stables with *ad libitum* access to water, hay and mineral salt. Mares were divided into two groups: young ( $< 8$  years,  $n = 15$ ) and old ( $\geq 8$  years,  $n = 15$ ). The data collection was carried out in the “Miguel Ángel de Cárdenas” stud farm and located at San Pablo Farm (Écija, Seville, Spain). Animal care was fully in compliance with the University of Cordoba requirements on animal welfare and experimentation (2021PI/19).

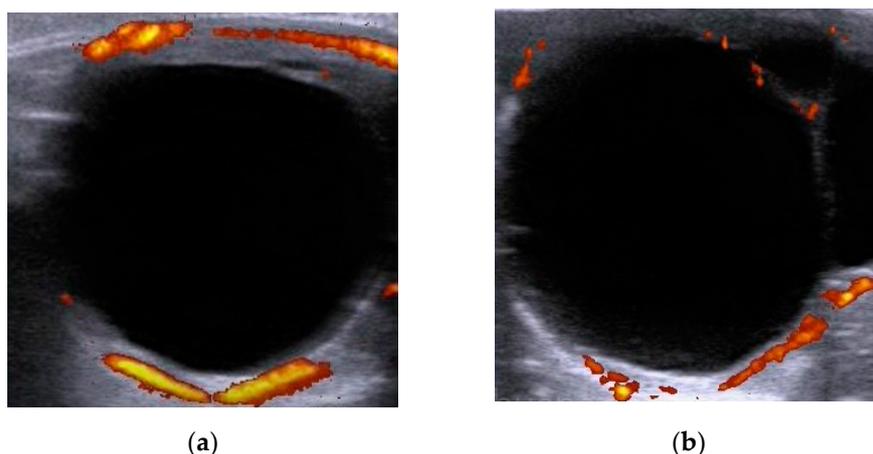
### 2.2. Mare Management

All mares in this study underwent ovulation induction by administering a single IV injection of one dose of 3000 IU hCG (VETERIN CORION®). In all of them, the appearance of ovulation was recorded between 24- and 48-h post-administration by ultrasound. When the follicular diameter was  $\geq 35$  mm, endometrial edema was verified by ultrasound and consistent cervical tone by rectal palpation [11].

Artificial insemination was carried out with refrigerated semen obtained from stallions from the herd itself. Pregnancy diagnosis was not included. In this study, it was decided to avoid sedation of the females to prevent the possible vasodilator effects of the sedative, although it minimizes artifacts in the color Doppler video recording.

### 2.3. Ultrasonography

The ultrasound examinations (US) were performed by the first author, with a US-B-mode and Doppler using the MyLabOneVet ultrasound (ESAOTE, Barcelona, Spain). The device was equipped with a 6–10 MHz multifrequency linear transducer. All the US were performed by the same person to minimize the possible differences in the uptake and, consequently, the interpretation of the ultrasound images. The images were always captured with the same settings (10 MHz frequency, 70% mode B gain and 40% Power Doppler gain) and were recorded for later analysis on the same ultrasound machine. For Power Doppler imaging, a 30-s video was made of each structure from which 3 representative images were selected. Using the online version of Image Colour Summarizer<sup>®</sup> software, the chosen images were analyzed. This software allows the quantification of the percentage of colored pixels existing in an image, representative of ovarian blood flow. This technique transforms a qualitative analysis into a quantitative one. The user only has to introduce the file and process the selected image. Through the sum of all the colored pixels, the percentage of existing blood flow is obtained. The recorded Power Doppler images were taken in mares with preovulatory follicles  $\geq 35$  mm (Figure 1), which coincided with the administration of hCG (ovulation induction). The ovulation time was assumed between 36–40 h post-administration of hCG. The CL examination was  $5.83 \pm 0.62$  and  $6.40 \pm 0.54$  days in young and old age groups, respectively.



**Figure 1.** Representative image of preovulatory follicles, obtained at the time of ovulation induction, using Power Doppler ultrasound. (a) Blood flow follicle of a young mare; (b) Blood flow follicle of an aged mare.

Care was taken to do detailed examinations of the ovaries and uterus allowing a correct interpretation of the follicular dynamics. Along with the examination of both ovaries, images of the uterus were also recorded for a more complete analysis of the mare's reproductive dynamics.

In order to minimize possible errors and make the image of each ultrasound moment as representative as possible, the average of the parameters evaluated (diameter of the preovulatory follicle, percentage of FBF, area of the CL and percentage of CLBF) in the 6 images recorded from the total number of mares was evaluated. The mean value of the four ultrasound parameters studied was used for the statistical analysis.

### 2.4. Progesterone Assay

Jugular vein blood samples were obtained using heparinized 4 mL vacutainers, centrifugated ( $1000 \times g$  for 10 min at 18–25 °C) and plasma decanted and stored ( $-20$  °C) until progesterone assay. Progesterone was evaluated with the commercial ELISA method EIA-5223 (DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany) which is specifically dedicated to equine [12].

### 2.5. Statistical Analysis

SAS University Edition 3.8 (SAS Institute, Cary, NC, USA) was used in the statistical analysis. The GLM procedure was used to investigate differences in ultrasound parameters and blood plasma progesterone concentrations due to age. Regression analysis in the GLMSELECT procedure was used to investigate the relationship between progesterone concentrations and CLBF. Model performance was assessed by the coefficient of determination ( $R^2$ ), the root of the mean square of prediction error (RMSPE), the RMSPE expressed as a proportion of the observed mean (%RMSPE), and the concordance correlation coefficient (CCC). Furthermore, the mean square of prediction error (MSPE) was decomposed into mean bias (measure of precision), slope bias (measure of accuracy), and random error [9]. Statistical significance was declared at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

All of the 30 mares ovulated within the first 48 h ( $38.8 \pm 1.3$  h) after hCG treatment. The results from follicular and CL measurements and blood plasma progesterone concentrations are presented in Table 1. Blood plasma progesterone concentrations denoted that CL was functional.

**Table 1.** Mean  $\pm$  standard deviation (SD), minimum (Min) and maximum (Max) values of the follicle and corpus luteum ultrasonic parameters and blood plasma progesterone concentration from mares included in the study ( $n = 30$ ).

Parameters	Age Group								
	Old			Young			Total		
	Mean $\pm$ SD	Min	Max	Mean $\pm$ SD	Min	Max	Mean $\pm$ SD	Min	Max
Follicular diameter (mm)	42.12 $\pm$ 2.58	38.40	46.30	43.67 $\pm$ 2.94	38.60	49.00	42.89 $\pm$ 2.83	38.40	49.00
Follicular blood flow (%)	6.63 $\pm$ 1.31	4.20	8.53	8.00 $\pm$ 1.59	5.68	11.20	7.31 $\pm$ 1.59	4.20	11.20
Corpus luteum area (mm)	7.12 $\pm$ 1.27	4.38	8.63	7.79 $\pm$ 1.23	4.38	9.50	7.46 $\pm$ 1.27	4.38	9.50
Corpus luteum blood flow (%)	16.78 $\pm$ 3.29	12.21	22.53	21.09 $\pm$ 20	16.65	23.85	18.94 $\pm$ 3.46	12.21	23.85
Progesterone (ng/mL)	5.04 $\pm$ 0.65	4.20	6.30	8.16 $\pm$ 0.46	7.36	8.90	6.60 $\pm$ 1.68	4.20	8.90

Table 2 shows the comparison between both age groups. Young mares had significantly higher FBF ( $p < 0.05$ ), CLBF ( $p < 0.001$ ) and plasma progesterone levels ( $p < 0.001$ ). The CL area and follicular diameter were non significant ( $p > 0.05$ ).

**Table 2.** Least squares mean of ultrasonic parameters and progesterone concentrations.

Parameters	Age Group			
	Old	Young	SEM <sup>1</sup>	$p$
Follicular diameter (mm)	42.12	43.67	0.51	0.13
Follicular blood flow (%)	6.63	8.00	0.29	<0.05
Corpus luteum area (mm)	7.12	7.79	0.23	0.15
Corpus luteum blood flow (%)	16.78	21.09	0.63	<0.001
Progesterone (ng/mL)	5.04	8.15	0.30	<0.001

<sup>1</sup> Standard error of the mean.

The best regression models obtained in the present study for predicting progesterone concentrations from CLBF data shown in Table 1 are presented in Equation (1) (all data), (2) (young mares) and (3) (aged mares).

$$P_4 \text{ (ng/mL)} = -0.392 (\pm 1.1418) + 0.369 (\pm 0.0593) \times \text{CLBF} \\ R^2 = 0.58; \text{RMSPE} = 1.01 \text{ ng/mL}; \% \text{RMSPE} = 16.2\%; \text{CCC} = 0.73 \\ p < 0.001 \quad (1)$$

$$P_4 \text{ (ng/mL)} = 4.878 (\pm 0.9960) + 0.1555 (\pm 0.0470) \times \text{CLBF}$$

$$R^2 = 0.46; \text{RMSPE} = 0.33 \text{ ng/mL}; \% \text{RMSPE} = 4.0 \%; \text{CCC} = 0.63$$

$$p < 0.01$$
(2)

$$P_4 \text{ (ng/mL)} = 2.966 (\pm 0.7313) + 124 (\pm 0.0428) \times \text{CLBF}$$

$$R^2 = 0.39; \text{RMSPE} = 0.49 \text{ ng/mL}; \% \text{RMSPE} = 9.7 \%; \text{CCC} = 0.56$$

$$p < 0.05$$
(3)

Three models were significant and showed moderate precision, moderate to high accuracy, and moderate to weak reproducibility according to  $R^2$ , RMSPE, %RMSPE and CCC values. Furthermore, precision and accuracy were reinforced by the fact that none of the models showed mean or linear bias, with nearly 100% of MSE due to random error. The best equation in terms of precision and reproducibility was Equation (1), but it had less accuracy than the other two equations.

#### 4. Discussion

It is common to find aged mares in herds for their genetic value and for their performance. Reproductive aging in mares is a physiological process that affects their fertility; thus, it must be understood how reproductive parameters change with age [13]. The association between Power Doppler and hormonal measurements throughout the mare's oestrus cycle could allow to evaluate the reproductive ability in mares [14,15]. Power Doppler is a non-invasive technique that permits the visualization of the internal organs. It has the advantage of being non-disruptive to functions, without the risk of exposure to X-ray radiation, and it allows frequent use, not only in isolated reproductive organs, but also the monitoring of complete reproductive events and ovarian hemodynamics [11,16,17].

In the current study, Power Doppler allowed us to find significant differences in the follicular and CL vascular perfusion between young and aged mares 5–7 days after ovulation in concordance with Campos [8]. Our results agree with Bollwein et al. [4], Ginther et al. [18] and Alonso et al. [19], who reported maximum vascularization between 6-days and 8-days post-ovulation. It is well known that luteal vascularization is important in the supply of the nutrients and substrates required for the optimal function and maturity of the CL [20].

No differences were detected regarding follicle diameter and CL area in agreement with previous studies [21,22]. Consistent with those authors, age is a critical factor that influences the quantity and quality of the equine preantral follicle.

The concentrations of progesterone obtained denoted that corpora lutea were functional in all mares. The blood plasma progesterone levels quantified in this study support that the young mares CL, from the fifth day after ovulation, had the functional ability to preserve the pregnancy until the placenta assumes its function [17]. Although aged mares had lower progesterone concentrations than younger ones, the values were higher than the minimal plasmatic level (4 ng/mL). Therefore, a low reproductive performance would not be expected in the aged mares of the current study [23]. Again, the physiological cause of the significant differences in plasma progesterone concentration between aged and young mares would be related to changes in characteristics of reproductive cycles [24]. Aging in mares affects the development of the dominant follicle. Moreover, higher postovulatory plasma progesterone concentrations in young vs. aged mares have been previously reported [25,26]. Although we used hCG treatment for ovulation induction, we did not establish the correlation between that treatment and progesterone concentrations. A study performed by Alonso et al. [19] suggested that hCG treatment did not rise progesterone concentrations.

In the present study, CLBF was found to be a moderately good predictor of plasma progesterone levels. These results would support the interest in Power Doppler as a non-invasive technique to quantify plasma progesterone levels in cycling mares. Moreover, CLBF and progesterone levels in mares have been found to be positively correlated [4,27]. Using the data presented by Ishak et al. [27] in Equation 1, plasma progesterone levels

would be underpredicted by 21% from CLBF, which suggests that this kind of prediction needs refinement.

Sales et al. [17] found that Doppler ultrasound correlates with the progesterone concentration and the embryo transfer day in Mangalarga Marchador mares, which indicates that Doppler ultrasound could be an important tool in the selection of appropriate embryo recipient mares in Spanish Purebred.

## 5. Conclusions

Our results support that age is a factor that significantly influences FBF and CLBF as well as the plasma progesterone concentration in mares. Power Doppler was useful to assess ovarian hemodynamics. Progesterone plasma levels could be predicted from CLBF measured by power Doppler. More studies are needed to enhance the precision and accuracy of such predictions.

**Author Contributions:** Conceptualization, F.R. and E.I.A. methodology, F.R. and M.J.A.P.M.C.; software M.J.A.P.M.C.; formal analysis, A.L.M.M.; investigation, M.J.A.P.M.C., F.R. and R.C.; resources, M.J.A.P.M.C. and R.C.; data curation, A.L.M.M. and E.I.A.; writing—original draft preparation, E.I.A. and F.R.; writing—review and editing, E.I.A., F.R., R.C., A.L.M.M., M.J.A.P.M.C. and R.M.G.-P.; supervision, E.I.A. and F.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was approved by the Ethics Committee of Universidad de Córdoba, Spain (protocol code 2021PI/19).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available in the article.

**Acknowledgments:** Miguel Ángel de Cardenas stud farm is gratefully acknowledged for providing the mares and allowing their staff to collaborate in this study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Cuervo-Arango, J.; Newcombe, J.R. Ultrasound confirmation of ovulation in mares: A normal corpus luteum or a haemorrhagic anovulatory follicle? *Reprod. Domest. Anim.* **2013**, *48*, 105–111. [[CrossRef](#)]
2. Järvelä, I.Y.; Sladkevicius, P.; Kelly, S.; Ojha, K.; Nargund, G.; Campbell, S. Three-dimensional sonographic and power Doppler characterization of ovaries in late follicular phase. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **2002**, *20*, 281–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Castro, T.; Oliveira, F.A.; Siddiquim, M.A.; Baldrighi, J.M.; Wolf, C.A.; Ginther, O.J. Stimulation of LH, FSH and luteal blood flow by GnRH during the luteal phase in mares. *Theriogenology* **2016**, *85*, 740–746. [[CrossRef](#)]
4. Bollwein, H.; Mayer, R.; Weber, F.; Stolla, R. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology* **2002**, *57*, 2043–2051. [[CrossRef](#)]
5. Vecchio, D.; Neglia, G.; Gasparrini, B.; Russo, M.; Pacelli, C.; Prandi, A.; D’Occhio, M.J.; Campanile, G. Corpus luteum development and function and relationship to pregnancy during the breeding season in the Mediterranean buffalo. *Theriogenology* **2012**, *77*, 1811–1815. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Esposito, L.; Salzano, A.; Russo, M.; de Nicola, D.; Prandi, A.; Gasparrini, B.; Campanile, G.; Neglia, G. Corpus Luteum Color Doppler Ultrasound and Pregnancy Outcome in Buffalo during the Transitional Period. *Animals* **2020**, *13*, 1181. [[CrossRef](#)]
7. Robinson, N.E.; Sprayberry, K.A. *Current Therapy in Equine Medicine*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2009.
8. Campos, M.J.A.P.M. Utilização de Doppler na Avaliação Hemodinâmica Ovárica de Éguas Pura Raça Espanhola: Estudo Piloto. Ph.D. Thesis, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2017.
9. Orden APA/3319/2002, de 23 de Diciembre por la que se Establecen las Normas Zootécnicas del Caballo Pura Raza Español; BOE-A-2002-25418; Boletín Oficial del Estado: Madrid, Spain, 2002.
10. Henneke, D.R.; Potter, G.D.; Kreider, J.L.; Yeates, B.F. Relationship between condition score, physical measurements, and body fat percentage in mares. *Equine Vet. J.* **1983**, *15*, 371–372. [[CrossRef](#)]
11. Brogan, P.T.; Henning, H.; Stout, T.A.E.; Ruijter-Villani, M. Relationship between colour flow Doppler sonographic assessment of corpus luteum activity and progesterone concentrations in mares after embryo transfer. *Anim. Reprod. Sci.* **2016**, *166*, 22–27. [[CrossRef](#)]

12. Dufour, P.; Courtois, J.; Seynaeve, Y.; Peeters, S.; Le Goff, C.; Cavalier, E.; Ponthier, J. Development and validation of a liquid chromatography coupled to mass spectrometer (LC-MS) method for the simultaneous quantification of estrone-3-sulfate, progesterone, estrone and estradiol in serum of mares and American bison. *Res. Vet. Sci.* **2021**, *136*, 343–350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Claes, A.; Ball, B.A.; Scoggin, K.E.; Roser, J.F.; Woodward, E.M.; Davolli, G.M.; Squires, E.L.; Troedsson, M.H.T. The influence of age, antral follicle count and diestrous ovulations on estrous cycle characteristics of mares. *Theriogenology* **2017**, *15*, 34–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ginther, O.J.; Gastal, E.L.; Gastal, M.O.; Beg, M.A. Effect of prostaglandine F2 alfa on ovarian, adrenal, and pituitary hormones and on luteal blood flow in mares. *Domest. Anim. Endocrinol.* **2007**, *32*, 315–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ferreira, J.C.; Ignacio, F.S.; Meira, C.D. Doppler ultrasonography principles and methods of evaluation of the reproductive tract in mares. *Acta Sci. Vet.* **2001**, *39*, 105–111.
16. Echevarria, L. La ecografía como técnica. *Rev. Investig. Vet. Perú* **2001**, *12*, 2.
17. Sales, F.A.B.M.; Azevedo, M.V.; Souza, N.M.; Ferreira-Silva, J.C.; Chaves, M.S.; Junior, V.R.; Rocha, J.M.; Dos Santos Filho, J.P.; Freitas, V.J.F.; Oliveira, M.A.L. Correlations of corpus luteum blood flow with fertility and progesterone in embryo recipient mares. *Trop Anim. Health Prod.* **2021**, *22*, 280. [[CrossRef](#)]
18. Ginther, O.J.; Gastal, E.L.; Gastal, M.O.; Utt, M.D.; Beg, M.A. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Anim. Reprod. Sci.* **2007**, *99*, 213–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Alonso, M.A.; Silva, L.A.; Affonso, F.J.; Lemes, K.M.; Celeghini, E.C.C.; Lan, R.; Carvalho, H.F.; de Arruda, R.P. Effect of hCG application at different moments of the estrous cycle on corpus luteum and uterine vascularization and serum progesterone concentration in mares. *Anim. Reprod.* **2019**, *24*, 317–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Ginther, O.J. *Reproductive Biology of the Mare. Basic and Applied Aspects*, 2nd ed.; Equineservice Publishing: Cross Plains, WI, USA, 1992.
21. Alves, K.A.; Alves, B.G.; Gastal, G.D.A.; Haag, K.T.; Gastal, M.O.; Figueiredo, J.R.; Gambarini, M.L.; Gastal, E.L. Preantral follicle density in ovarian biopsy fragments and effects of mare age. *Reprod. Fertil. Dev.* **2017**, *29*, 867–875. [[CrossRef](#)]
22. Gastal, E.L.; Aguiar, F.L.N.; Gastal, G.D.A.; Alves, K.A.; Alves, B.G.; Figueiredo, J.R. Harvesting, processing, and evaluation of in vitro-manipulated equine preantral follicles: A review. *Theriogenology* **2020**, *156*, 283–295. [[CrossRef](#)]
23. Marinone, A.I.; Mucci, N.; Kaiser, G.; Losinno, L.; Armendano, J.; Rodriguez, E.; Mutto, A.; Redolatti, C.; Cantatore, S.; Herrera, M.F.; et al. Reproductive Characteristics in old and young subfertile mares: Are they really different? *J. Equine Vet. Sci.* **2017**, *55*, 90–96. [[CrossRef](#)]
24. Carnevale, E.M. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. *Theriogenology* **2008**, *61*, 23–30. [[CrossRef](#)]
25. Vanderwall, D.K.; Woods, G.L.; Freeman, D.A.; Weber, J.A.; Rock, R.W.; Tester, D. F (1993). Ovarian follicles, ovulations and progesterone concentrations in aged versus young mares. *Theriogenology* **1993**, *40*, 21–32. [[CrossRef](#)]
26. Fonda, E.S.; Hackett, G.E.; Burrill, M.J.; Cogger, E.A. A comparison of LH and progesterone secretion in young and aged mares. *J. Anim. Sci.* **1988**, *1*, 429.
27. Ishak, G.M.; Bashir, S.T.; Gastal, M.O.; Gastal, E.L. Pre-ovulatory follicle affects corpus luteum diameter, blood flow, and progesterone production in mares. *Anim. Reprod. Sci.* **2017**, *187*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]