



**ESTUDIO
RETROSPECTIVO DEL
INTERVALO ENTRE LA
ADMINISTRACIÓN DE
PROSTAGLANDINA F2-
ALFA Y OVULACIÓN
SOBRE LA TASA DE
PREÑEZ EN LA YEGUA Y
OTROS FACTORES
REPRODUCTIVOS**

**SANDRA MATEU SÁNCHEZ
FACULTAD DE VETERINARIA**



FACULTAD DE VETERINARIA

GRADO EN VETERINARIA

TÍTULO DEL TRABAJO: ESTUDIO RETROSPECTIVO DEL INTERVALO ENTRE LA ADMINISTRACIÓN DE PROSTAGLANDINA F2-ALFA Y OVULACIÓN SOBRE LA TASA DE PREÑEZ EN LA YEGUA Y OTROS FACTORES RELACIONADOS

NOMBRE: SANDRA MATEU SÁNCHEZ

TIPOLOGÍA TIPO B: TRABAJO ORIGINAL

MONCADA (VALENCIA), 18 DE JUNIO DE 2015

RESUMEN: Las prostaglandinas F2-alfa (PGF) juegan un papel importante en la luteolisis y entrada al estro de las yeguas, y se han convertido en una herramienta fundamental en el manejo veterinario de la reproducción equina. El objetivo de este estudio es determinar el efecto del intervalo entre el tratamiento de la prostaglandina y la ovulación (ITO) con la tasa de preñez, la tasa de ovulación múltiple (OM) y el diámetro del folículo dominante en el momento del tratamiento en un estudio retrospectivo. Se recopilaron 676 ciclos de 6 años consecutivos durante una estancia en un hospital equino de Dinamarca. Los resultados muestran que, cuanto mayor es el ITO, mayor es la tasa de preñez. Además, la tasa de OM es mayor cuando se administra prostaglandina. Por último, cuanto mayor es el folículo dominante, menos tiempo tarda en ovular. En conclusión, el uso de la prostaglandina ejerce un efecto nada despreciable en estos tres parámetros utilizados continuamente en el campo de la reproducción equina.

Palabras clave: Fertilidad, PGF_{2α}, yegua.

ABSTRACT: Prostaglandins F2-alpha play an important role with luteolysis and coming on oestrus in some species, like mares, and they have become in an indispensable tool for equine vet reproduction. The objective of this study was to determine the effect of the interval from treatment with prostaglandin to ovulation on the pregnancy rate, multiple ovulation and dominant follicle diameter at the treatment moment in a retrospective study. 676 cycles from 6 consecutive years were recorded during a stay in an equine hospital at Denmark. Results showed that the PR was higher if the ITO was higher. Multiple ovulation was increased in the prostaglandin treatment group. In addition, the ITO was shorter when the dominant follicle diameter was bigger. In conclusion, exogenous prostaglandin has an important effect with these three parameters which are really used in the equine reproduction area.

Keywords: Fertility, mare, PGF_{2α}.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	6
INTRODUCCIÓN	7
OBJETIVOS.....	11
METODOLOGÍA	11
RESULTADOS.....	14
DISCUSIÓN	17
CONCLUSIONES	22
BIBLIOGRAFÍA.....	23

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.</i> Efecto del ITO en la tasa de preñez, ovulación múltiple y preñez gemelar.....	15
<i>Tabla 2.</i> Resultados según tipo de semen utilizado.....	16

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Correlación entre diámetro folicular e ITO.....	17
--	-----------

ÍNDICE DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

CL: Cuerpo lúteo

FSH: Hormona folículo-estimulante

hCG: Gonadotropina coriónica humana

IIO: Intervalo interovulatorio

ITO: Intervalo tratamiento PGF-ovulación

LH: Hormona luteinizante

OM: Ovulación múltiple

P4: Progesterona

PG: Preñez gemelar

PGF: Análogo de PGF_{2α}

PGF_{2α}: Prostaglandina natural

PSI: Pura Sangre Inglés

TP: Tasa de preñez

INTRODUCCIÓN

La prostaglandina F2 alfa ($PGF_{2\alpha}$) es una hormona presente en las especies mamíferas y que realiza diversas y variadas funciones en determinados sistemas del animal (Pike, 1971). En concreto, respecto al sistema reproductor en la yegua se ha estudiado que ejerce un efecto determinante sobre aspectos como la ovulación (Savage and Liptrap, 1987; Weems, 2006), el descenso del embrión por el oviducto (Freeman *et al.*, 1992), la producción de contracciones en el útero, también llamado efecto ecbólico (Stout, 2011), la inducción del parto (Jeffcott LB *et al.*, 1977) o la inducción del aborto (Baucus *et al.*, 1987).

Sin embargo, uno de los efectos más estudiados en este campo es la luteolisis inducida por la acción de las prostaglandinas endógenas que da el paso a un nuevo ciclo estral de ciertos mamíferos como la vaca o la yegua (McCracken *et al.*, 1972; Ginther, 1992). Lo que tiene lugar es la rotura o lisis del cuerpo lúteo (CL), encargado de producir progesterona (P4) durante el diestro; por tanto, la disminución de los niveles de la P4 por debajo de 1 ng/ml (Ginther, 1992) tiene como consecuencia la entrada de un nuevo estro, que es la fase del ciclo estral necesaria para que la yegua pueda concebir un embrión, ya que es en esta fase cuando se producirá el crecimiento y la ovulación del folículo dominante, que liberará el ovocito en el oviducto del tracto reproductor femenino para poder ser fecundado por el gameto masculino, el espermatozoide.

La duración del ciclo estral en la yegua se puede definir de diferentes formas. Uno de los términos más utilizados según la bibliografía es el intervalo interovulatorio (IIO), es decir, los días que transcurren desde una ovulación de un ciclo estral hasta la siguiente ovulación, definiendo el día 0 como el día de la ovulación (Ginther, 1992). Este término elimina la ambigüedad asociada con variaciones en los métodos de detección y definición de estro, así como consigue minimizar el error para aspectos como el estro silencioso, al que no podemos asignar un número concreto

de días en los que la yegua muestra el celo. En condiciones normales, la yegua puede mostrar signos de celo cuando la progesterona cae por debajo de 2 ng/ml en sangre (Asa *et al.*, 1984), y lo que se suele hacer para comprobar si la yegua está en celo es llevar a la yegua ante el semental y observar su comportamiento. Lo más común según la bibliografía es arquear la cola, permanecer quieta, guiños vulvares, flexión de extremidades posteriores y orinar (Ginther, 1992). Esto se conoce como recelar a la yegua, y es una práctica muy extendida en la reproducción equina, pero no es 100% fiable porque hay yeguas que muestran muy poco celo o nada, que es el estro silencioso que hemos citado antes.

El IIO en la yegua varía entre 18 y 26 días, con una media de 21 días (Ginther, 1992), así como también se ha observado que la luteolisis que se da en la yegua de forma espontánea tiene lugar en una media de 14.9 días tras la ovulación y que el estro tiene una duración media de 6.5 días, con una variación de 4.5 a 8.9 días (Ginther, 1992). Esta gran variabilidad depende de varios factores como son la raza, edad y época del año, ya que las yeguas son poliéstricas estacionales, es decir, la etapa ovulatoria o reproductiva varía en función de la época del año en la que se encuentren (Ginther, 1992). Todo esto hace que el veterinario requiera el uso de hormonas extrínsecas si se pretende manipular el ciclo estral de las yeguas, como por ejemplo para reducir el intervalo interovulatorio, avanzar la primera ovulación de la temporada o inducir el estro.

Es por esto que desde la década de los años 70, cuando se empezaron a estudiar los efectos de las prostaglandinas, se han desarrollado diversos fármacos que cumplen la función de la $PGF_{2\alpha}$, en concreto, los análogos sintéticos de la prostaglandina (PGF), como son el cloprostenol o el luprostiol (Staempfli, 2011). Hoy en día, la eficacia de estos fármacos está más que demostrada, tanto en lo que se refiere a provocar la luteolisis como a las otras funciones que hemos citado anteriormente (Oxender, *et al.*, 1975; Douglas *et al.*, 1975; Cuervo-Arango *et al.*, 2010, King *et al.*, 2010, Coffman *et al.*, 2014). Es importante decir que esta inducción de la luteolisis solo se produce en cuerpos lúteos que tienen una edad superior a 5 días

(Allen *et al.*, 1973; Douglas *et al.*, 1975; Ginther, 1992), aunque estudios recientes cuestionan esto, ya que, por un lado, se ha visto que la administración de PGF_{2α} exógena inducía la luteolisis de cuerpos lúteos con una existencia menor a 5 días, reduciendo el intervalo interovulatorio sin que eso afectara a la tasa de preñez de las yeguas (Coffman *et al.*, 2014). Por otro lado, en otro estudio se determinó que tuvo lugar una luteolisis parcial del cuerpo lúteo, ya que, al administrar PGF_{2α} en las yeguas 3 días después de la ovulación, tuvo lugar una reducción del intervalo interovulatorio con respecto al grupo control, pero las yeguas no entraron en estro y la concentración de progesterona volvió a crecer 3 días después del tratamiento con la PGF_{2α} en el 75% de las yeguas del grupo experimental (Bergfelt *et al.*, 2006).

Desde un punto de vista clínico, lo lógico sería pensar que cuanto más consigamos reducir el intervalo entre el tratamiento de la PGF y la ovulación, mayor efectividad se alcanzará en lo que se refiere a sincronizar estros y preñar yeguas, porque se empleará menos tiempo. No obstante, existe una gran variabilidad en lo que se refiere al intervalo entre el tratamiento de la prostaglandina y la ovulación (ITO), que va desde los 2 hasta los 16 días (Cuervo-Arango *et al.*, 2010; Newcombe JR *et al.*, 2008). Esta variación es debida al efecto de diversos factores sobre la duración de este intervalo, como son la dosis administrada de PGF_{2α} y el diámetro del folículo dominante en el momento del tratamiento luteolítico (Newcombe *et al.*, 2008; Pinto, 2013), entre otros. Estos autores describen que existe una correlación negativa entre el intervalo tratamiento PGF-ovulación y el diámetro folicular, ya que folículos con un diámetro mayor a 30 mm (considerados preovulatorios) en el momento de la administración de la PGF ovularon en menos de 5 días, mientras que folículos con un menor diámetro en el momento del tratamiento con PGF ovularon entre 7 y 12 días. Además, Newcombe *et al.*, (2008) describe que esa correlación negativa es estadísticamente significativa con respecto a todas excepto una de las dosis de cloprostenol que probaron en el estudio, las cuales fueron: 8.75, 75, 125, 250 y 625 µg (sin hacer distinción por el peso del animal). La

dosis de cloprostenol para la cual no se vio diferencia significativa fue de 25 µg, pero cabe decir que los resultados obtenidos con esta dosis no fueron significativamente distintos a los obtenidos con las otras dosis (respecto a los diferentes parámetros que se analizaron en el estudio, como el porcentaje de folículos ovulados o el ITO analizado). Por otro lado, se sabe que la vía de administración de la prostaglandina no influye en su efecto (Douglas *et al.*, 1975; Staempfli, 2011).

También se ha descrito que el porcentaje de ovulación múltiple aumenta en aquellas yeguas a las que se les ha administrado PGF_{2α} de forma exógena. En un estudio en el que, aunque en el grupo control (luteólisis espontánea) inicialmente hubo mayor número de yeguas con doble folículo dominante, se registró un 0% de ovulaciones dobles o múltiples, mientras que en el grupo experimental (administración de PGF_{2α} y ablación de todos los folículos con un diámetro mayor a 6 mm en el día 10 postovulación) se produjo la ovulación de un segundo folículo en el 86% de las yeguas que desarrollaron dos folículos dominantes, con una diferencia estadísticamente significativa (Ginther *et al.*, 2008). La ablación de los folículos en el momento de la administración de PGF_{2α} suprime el error de que un folículo dominante inhiba el crecimiento de otros folículos (Ginther, 1992), y así se puede ver el verdadero efecto de la PGF_{2α} sobre la tasa de ovulación múltiple. Además, en otro estudio se obtuvieron porcentajes de OM estadísticamente significativos entre las yeguas que ovularon en menos de 7 días después de la inyección de PGF_{2α} exógena y las yeguas que ovularon en más de 7 días post-tratamiento, con un porcentaje de 20.8% y 42.3%, respectivamente (Cuervo-Arango *et al.*, 2010).

Además de lo expuesto anteriormente, hay estudios que demuestran que un ITO corto influye negativamente en la tasa de preñez. Un estudio de 329 ciclos de yeguas Pura Sangre Inglés (PSI) revisados de forma retrospectiva obtuvo un porcentaje del 46.7% de tasa de preñez en el grupo de yeguas que ovularon de 4 a 7 días después de administrar la PGF, un dato estadísticamente inferior al obtenido tanto en el grupo control (luteólisis espontánea sin administración exógena de PGF) como en el grupo de

yeguas con un ITO más largo (73% y 67.7%, respectivamente) (Cuervo-Arango *et al.*, 2010). No obstante, la bibliografía respecto a este aspecto es más bien escasa. En este último artículo citado, los datos se obtuvieron de monta natural, pero no hay estudios realizados respecto a semen refrigerado o congelado, y sí que hay estudios que reflejan que el tipo de semen utilizado es un factor limitante de la tasa de preñez (Ginther, 1992).

OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es determinar el efecto del ITO sobre la tasa de preñez en yeguas inseminadas con semen refrigerado o semen congelado.

El objetivo secundario de este estudio es determinar el efecto del ITO sobre las tasas de ovulación múltiple, así como cuantificar el grado de correlación entre el diámetro del folículo dominante en el momento del tratamiento con PGF y el intervalo hasta la ovulación (ITO).

METODOLOGÍA

1. Localización del centro veterinario, animales e instalaciones

Los datos fueron obtenidos por la autora de este trabajo durante una estancia de cinco semanas en el hospital clínico veterinario Ansager Dyrehospital, situado en la población de Ansager (Dinamarca). Uno de los servicios que ofrece este hospital es el de inseminación artificial con semen congelado o refrigerado, a elección del dueño, y uno de los veterinarios del centro, especialista en reproducción equina, lleva íntegramente este servicio. Las yeguas, en su gran mayoría trotones, se alojan en una nave con boxes individuales adyacente al hospital, que es donde tiene lugar todo el seguimiento de las yeguas.

2. Rutina de trabajo

Se realizan 3 ecografías seriadas al día a las 8:00, 16:00 y 22:00 horas. Antes de la primera ecografía del día, los operarios llevan a la yegua delante del box del semental para que entre en contacto con la yegua y poder estimularla, y el veterinario anota el resultado del recelo. Si el recelo es negativo, la yegua no se examina y directamente se le inyecta 1 ml de luprostiol (Prosolvin®), y se recela los días siguientes hasta que el recelo deja de ser negativo, momento en el que comienza el seguimiento ecográfico del tracto genital (ovario y útero) seriados. El ecógrafo del que dispone el hospital es un Honda HS 2000V con una sonda de 7.5 MHz. Las yeguas se ecografían hasta que tiene lugar la ovulación del folículo dominante, lo cual se aprecia en la imagen como un cambio de un contenido esférico absolutamente anecoico (el líquido dentro del folículo) a un cambio en la forma y en la ecogenicidad del mismo lugar, pasando a ser muy ecogénico (el folículo se ha colapsado y ya no queda líquido en su interior) (Ginther, 1986). En ese momento, se busca el semen del semental que corresponde a cada yegua: en caso de ser refrigerado, habrá sido pedido el día anterior y se habrá mantenido en su recipiente a 5°C, pudiendo haber tratado a la yegua para que ovulara con la hormona coriónica humana (hCG), ya que tiene efecto luteinizante. En el caso del semen congelado, la granja dispone de distintos tanques de nitrógeno líquido en el que guarda las pajuelas de semen a -178°C. Cuando se requiere de una dosis, se extraen las pajuelas que sean necesarias (dependiendo de la dosis que se haya recibido y de la cantidad de semen que haya en cada pajuela, pudiendo ser de 0.50 ml, y lo normal es que se usen 4 u 8 pajuelas por dosis) y se mantienen un mínimo de 25 segundos en el agua a 37°C. Después, se secan bien las pajuelas para que el agua no entre en contacto con el semen, ya que es espermicida, y se insemina a la yegua, previa desinfección del perineo. El diagnóstico de gestación se realizaba el día 13 postovulación.

3. Diseño experimental

Se recopilaron un total de 676 ciclos de 393 yeguas durante la temporada reproductiva (de Marzo a Agosto) del año 2007 hasta el año 2013. De cada ciclo, se recogieron los siguientes parámetros de interés para el estudio:

- Tipo de semen empleado: Refrigerado o congelado.
- Número de ovulaciones: Pudiendo ser una ovulación simple (un solo folículo) o múltiple (más de un folículo) en el mismo estro.
- Tratamiento con PGF:
 - Grupo 1 (Grupo control): Luteolisis espontánea y entrada al estro sin uso de PGF.
 - Grupo 2 (Grupo experimental): Luteolisis inducida con PGF. Este grupo se dividió a su vez en 3 subgrupos en el siguiente parámetro recogido:
- Días desde la administración de la PGF hasta la ovulación (ITO): Solo para el grupo experimental.
 - Grupo 2A: Yeguas que ovularon en menos de 6 días desde el tratamiento.
 - Grupo 2B: Yeguas que ovularon entre 6 y 8 días post-tratamiento
 - Grupo 2C: Yeguas que ovularon 9 días o más post-tratamiento
- Diámetro del folículo en el momento de la administración de la PGF (expresado en milímetros). Solo para el grupo experimental.
- Diagnóstico de gestación, pudiendo ser positivo o negativo.
- Número de embriones: En el momento del diagnóstico de gestación.

El grupo experimental se subdividió en 3 grupos en relación a estudios anteriores realizados (Cuervo-Arango *et al.*, 2010). Además, se buscó una división lo más parecida a lo que pasaría en condiciones naturales después de una luteolisis endógena, considerando que el estro tiene una duración media de 6.5 días, con un intervalo de 4.5 a 8.9 días (Ginther, 1992) y

teniendo en cuenta que la progesterona tarda de 24 a 36 horas en disminuir por debajo de 1 ng/ml desde que se inicia la luteolisis (Bergfelt *et al.*, 2006).

4. Análisis estadístico

Todos los datos se recopilaron en una hoja de Microsoft Excel 2013. Para hallar las diferencias significativas se utilizó el test de Chi cuadrado, y el coeficiente Pearson para obtener correlaciones.

RESULTADOS

En la *Tabla 1* tenemos los porcentajes obtenidos en tasa de preñez, ovulación múltiple y preñez gemelar respecto al número total de ciclos recogidos. En ella se puede observar que la tasa de preñez del grupo control con respecto al grupo experimental no es diferente entre sí (44 y 45%, respectivamente, con una $P>0.05$), sin embargo, en las subdivisiones del grupo experimental, hechas como se ha explicado anteriormente según el ITO, se aprecia un cambio considerable en los distintos porcentajes, siendo notoriamente inferior en el grupo 2A (33%), similar en el grupo 2B (42%) y bastante superior en el grupo 2C (57%), este último con una diferencia estadísticamente significativa ($P<0.05$).

Con respecto al porcentaje de ovulación múltiple, observamos que en el grupo experimental es del 22%, estadísticamente superior al 14% del grupo control ($P<0.05$). Así mismo, en los subgrupos encontramos distintos porcentajes pero todos ellos son superiores al grupo control (16, 23 y 26%), con una diferencia estadísticamente significativa ($P<0.05$) de los grupos 2B (23%) y 2C (26%) con respecto al grupo control (14%).

Por último, respecto a la tasa de preñez gemelar, el porcentaje obtenido en el grupo control es similar ($P>0.05$) al obtenido en el grupo experimental (6% frente a 10%), pero, de nuevo, apreciamos grandes diferencias cuando vemos los resultados obtenidos en los subgrupos experimentales, ya que los grupos 2A y 2C alcanzan más del 30%, estadísticamente significativo

respecto al grupo control, mientras que en el grupo 2B no tiene lugar ninguna preñez gemelar.

Tabla 1. Efecto del ITO en la tasa de preñez, ovulación múltiple y preñez gemelar

Grupo	n	TP	OM	PG
1	426	44% ^a	14% ^a	6% (9/157) ^a
2	250	45% ^a	22% ^b	10% (10/104) ^a
2A	61	33% ^a	16% ^{a,b}	30% (3/10) ^b
2B	109	42% ^a	23% ^b	0% (0/25) ^a
2C	80	57% ^b	26% ^b	33% (7/21) ^b

Resultados de todos los ciclos, sin distinción del tipo de semen utilizado, en relación a tasa de preñez (TP), ovulación múltiple (OM) y preñez gemelar (PG) y siendo "n" el tamaño muestral del grupo. Las letras "a" y "b" expresadas como superíndices indican si existe diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$), siendo significativo cuando las letras son distintas y no siendo significativo cuando las letras coinciden.

En la *Tabla 2* tenemos el análisis de los mismos parámetros pero distinguiendo entre inseminación artificial con semen congelado y semen refrigerado, en la cual vemos que se repite el patrón en los subgrupos experimentales con respecto a la *Tabla 1*, excepto en el resultado obtenido en el grupo 2A de semen refrigerado, 53%, superior incluso al obtenido en el grupo control. También podemos observar que el grupo de semen refrigerado obtiene mejores tasas de gestación que el grupo de semen congelado. Si observamos ahora los resultados de la tasa de ovulación múltiple, vemos que también siguen el mismo patrón, esta vez sin excepción, con porcentajes siempre superiores al grupo control. Además, la tasa de MO en semen refrigerado es mayor en todos los grupos respecto a la tasa de MO en semen congelado. Por último, los subgrupos 2A y 2C de semen refrigerado tienen una tasa de preñez gemelar bastante mayor que la obtenida en semen congelado en los mismos subgrupos (25 y 29% respecto a 9 y 15%).

Tabla 2. Resultados según tipo de semen utilizado

Grupo	n _c	n _r	TP _c	TP _r	OM _c	OM _r	PG _c	PG _r
1	334	92	43% ^a	51% ^a	12% ^a	21% ^a	5% (6/114)	7% (3/43)
2	181	69	42% ^a	51% ^a	18% ^a	35% ^b	9% (6/71)	12% (4/33)
2A	46	15	27% ^a	53% ^a	13% ^a	27% ^{a,b}	9% (1/11)	25% (2/8)
2B	66	43	39% ^a	47% ^a	18% ^a	30% ^{a,b}	0% (0/26)	0% (0/20)
2C	69	11	56% ^b	64% ^a	20% ^a	64% ^{a,b}	15% (5/34)	29% (2/7)

Resultados de los ciclos en diferentes columnas distinguiendo entre semen congelado o refrigerado, siendo "n_c" el tamaño muestral de semen congelado, "n_r" el de semen refrigerado, TP_c y TP_r la tasa de preñez para semen congelado y la de refrigerado, respectivamente, OM_c y OM_r la tasa de ovulación múltiple para semen congelado y refrigerado, respectivamente, y por último, PG_c y PG_r para la tasa de preñez gemelar tanto para semen congelado como refrigerado, respectivamente. Las letras "a" y "b" expresadas como superíndices indican si existe diferencia estadísticamente significativa (P<0.05), siendo significativo cuando las letras son distintas y no siendo significativo cuando las letras coinciden.

En el *Figura 1* establecemos la relación entre el diámetro del folículo más grande (folículo dominante) y el intervalo entre el tratamiento con la prostaglandina y la ovulación del folículo. El coeficiente Pearson (r= -0.59; P<0.05) indica que la correlación es negativa y estadísticamente significativa, esto es, a mayor diámetro del folículo, más corto es el ITO.

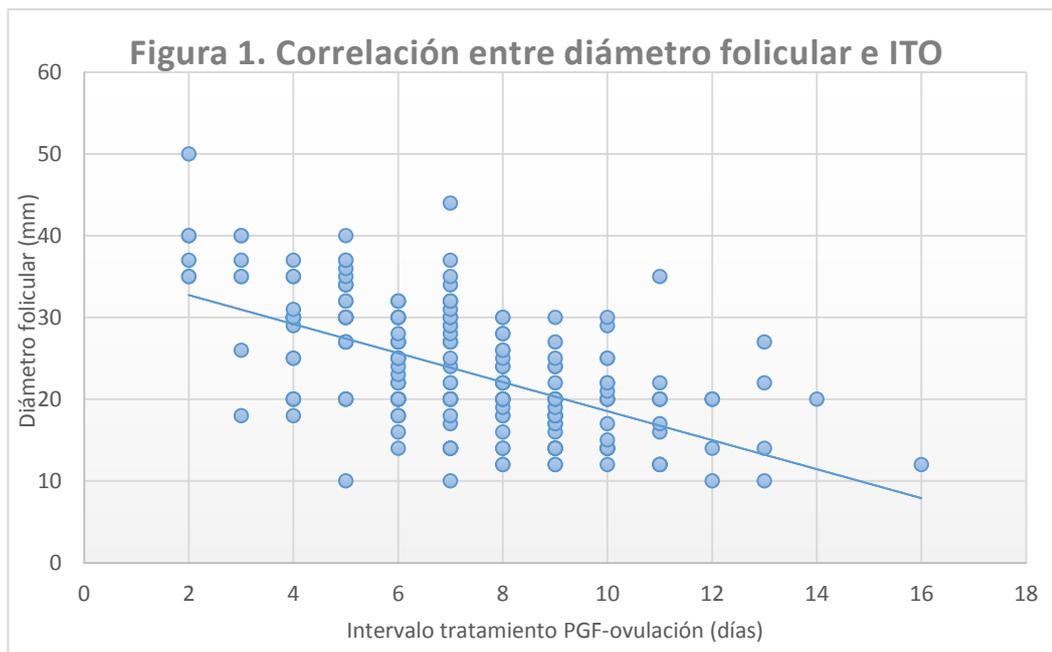


Figura 1. Relación entre el diámetro del folículo dominante (en milímetros) e intervalo entre el tratamiento de la PGF y la ovulación (en días). Coeficiente Pearson = -0.59, esto quiere decir que la correlación es negativa.

DISCUSIÓN

Como hemos analizado en la *Tabla 1*, el intervalo entre el tratamiento con PGF_{2α} y ovulación tiene un efecto relevante sobre la tasa de preñez, estableciendo una correlación positiva entre estos dos parámetros: a mayor ITO, mayor TP. Además, es de destacar que el grupo 2B obtenga los porcentajes más similares con respecto al grupo control, ya que el intervalo establecido para este grupo es lo más aproximado a lo que tendría lugar de manera fisiológica en la yegua después de la luteolisis, una fase estral con una media de 6.5 días, desde 4.5 a 8.9 días (Ginther, 1992). Por otro lado, la tasa de preñez obtenida en el grupo 2A es sorprendentemente baja (33%), incluso más que en un estudio anterior en el que se registró un 46.7% (Cuervo-Arango *et al.*, 2010). Cabe destacar que en este estudio citado se analizaron ciclos de yeguas preñadas mediante monta natural, lo que hace partir de la base de unas tasas de preñez mayores que en inseminación artificial con semen congelado y/o refrigerado. De hecho, esto

lo podemos apreciar en el grupo control, ya que en el susodicho estudio se obtuvo un 73.7% mientras que en nuestro estudio se obtuvo un 44%. Así pues, resulta llamativo que, cuando vemos los resultados de semen congelado y refrigerado por separado (*Tabla 2*), la TP de inseminación con semen congelado es incluso menor que un tercio (27%), pero en cambio la de semen refrigerado es muy buena, superando incluso al grupo control (53%). Este último resultado no concuerda con el resto del estudio, posiblemente la causa sea el bajo número de tamaño muestral del grupo, que es de 15 ciclos, y por tanto deberíamos disponer de más datos para evaluar si es un resultado fiable o no.

No se conoce la causa de que el subgrupo 2A tenga unas tasas de gestación más bajas que el resto, una de las hipótesis más probable es que los folículos que ovulan son folículos que se han desarrollado durante un prolongado tiempo en diestro, y que por tanto la progesterona puede tener un efecto perjudicial en el desarrollo de este folículo o que el ovocito que se encuentra dentro de este ya es viejo y ha dejado de ser funcional cuando tiene que ser fecundado (Cuervo-Arango *et al.*, 2010). Otra teoría que se baraja es que las yeguas con un período de tiempo tan corto entre la luteolisis y la ovulación no hayan desarrollado el estro adecuadamente y tengan una reacción inflamatoria endometrial mayor que el resto o, simplemente, que el cérvix no se haya relajado lo suficiente como para permitir la evacuación de fluido post-uterino de una forma más eficaz (Pycock, 2007). En este estudio no se dispone de la suficiente información para buscar una correlación entre yeguas con una mayor inflamación pos-coital y los ITO más cortos, ya que no se realizaba un seguimiento ecográfico posterior a la ovulación e inseminación para buscar reacción inflamatoria excesiva o grado de apertura del cérvix.

En contrapartida a los resultados del grupo 2A tenemos el grupo 2C con resultados incluso mejores que el grupo control, y posiblemente la razón venga relacionada con lo postulado anteriormente, ya que el grupo 2C es el grupo en el que mayor tiempo transcurrió entre el tratamiento y la

ovulación, y por tanto podemos decir que los folículos se desarrollaron de manera correcta y la relajación del cérvix fue completa.

Respecto a la *Tabla 2*, el porcentaje obtenido en tasa de preñez del grupo control del semen refrigerado, 51%, es ligeramente inferior a la recopilada en la bibliografía: 53.9% (Sieme *et al.*, 2013), 56% (Vidament, 2005) y 69.6% (Crowe *et al.*, 2008). Lo mismo pasa con el semen congelado, 43%, mientras que estudios anteriores muestran unos porcentajes del 42.8% (Sieme *et al.*, 2003), 49% Vidament, 2005) y 53.5% (Loomis, 2001). Sin embargo, no es una diferencia tan sustancial que requiera de una explicación, ya que las tasas de gestación varían mucho dependiendo de la fuente consultada, porque usan diferentes protocolos o tienen en cuenta más o menos variables en el estudio, además, la fertilidad intrínseca de cada semental también puede afectar a los porcentajes (Ginther, 1992).

Los resultados obtenidos en este estudio sobre la tasa de ovulación múltiple coinciden con estudios anteriores (Katila, 2003; Dalin, 2008), ya que hay una mayor incidencia significativa en la tasa de OM obtenida en el grupo al que se administró PGF respecto al que no se le administró. Por otro lado, los resultados obtenidos en el grupo control coincide con el 13-15% de OM que describe la bibliografía que es típica de esta raza, los trotones (Ginther, 1992), ya que la tasa de OM varía según razas. Resulta llamativo que la diferencia entre grupo experimental y de control no sea tan grande en semen congelado (no es estadísticamente significativa), pero sí que lo sea en semen refrigerado (12 y 18% para congelado, 21 y 35% para refrigerado). No debería existir diferencia entre estos dos grupos (en términos porcentuales), ya que el protocolo hasta la ovulación es el mismo tanto para semen congelado como refrigerado, en ambos casos se realizaba la inseminación en cuanto se detectaba que el folículo había ovulado y se usaba la misma hormona en el caso de querer inducir la ovulación (hCG), si bien es verdad que la incidencia del uso de esta hormona es mayor en el grupo de semen refrigerado (33% frente a 5% en los grupos experimentales), puesto que en el caso del semen refrigerado no se dispone del semen en la misma granja, hay que pedirlo a la yeguada

donde tengan al semental, y normalmente tardan unas 24-30 horas desde que se realiza la extracción de semen hasta que llega a la granja. Además, una vez que se realiza la inseminación, el semen no sobrevive más de 24 horas dentro de la yegua, aunque se han descrito numerosos casos de semen viable hasta 48 horas post-inseminación (Newcombe, 2015), por eso es tan importante que el veterinario sincronice la ovulación con la recepción del semen más de un día antes de recibirlo, y la hCG asegura la ovulación del 83% de las yeguas en menos de 48 horas (Ferris *et al.*, 2012). No obstante, no existe ninguna referencia bibliográfica que correlacione el uso de hCG con un aumento en el porcentaje de ovulaciones múltiples, con lo que el uso de hCG no debería ser la razón por la cual el grupo experimental del semen refrigerado tiene una mayor incidencia de OM que el del semen congelado. Tampoco parece que haya sido por una correlación entre el uso de la PGF y la hCG, ya que en ambos grupos control encontramos, de la misma manera, una mayor tasa de OM en el grupo de semen refrigerado que en el de congelado (21% y 12%, respectivamente).

Otra posible explicación la encontramos en otro estudio (Bergfelt, 2006), en el que se encontró de forma casual que la tasa de OM era mucho mayor en el grupo al que se le administró PGF_{2α} el día 3 postovulación (35%) que en el grupo del tratamiento en el día 10 postovulación (6%). En este caso, el estudio se hizo con Cuarto de Milla y Apaloosas, que tienen una media de 8 a 10% de OM (Ginther, 1995), con lo que el 35% encontrado resulta bastante llamativo. También hay que destacar que en ambos grupos tuvo lugar el mismo ITO, con lo que el alto porcentaje de OM no se puede explicar por diferencias en el ITO (en ambos grupos, la ovulación tuvo lugar 9-10 días post-tratamiento). La teoría que baraja el autor es que la PGF_{2α} puede incrementar la concentración de la hormona folículo-estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), ambas relacionadas con el crecimiento folicular y la ovulación (Ginther, 1992), pero también sugiere que se necesita profundizar en este tema para encontrar una explicación respaldada con más datos.

Respecto a la tasa de preñez gemelar, resulta llamativo el resultado obtenido en el subgrupo 2B, ya que, aunque el tamaño muestral no es muy amplio (25 ciclos), no se obtuvo ninguna preñez gemelar. Parece ser que no existe ninguna explicación convincente para esto y convendría ampliar el tamaño muestral para evaluar si esto es real o es un error de falta de datos. No se puede decir que la causa sea el uso de PGF, ya que en los otros dos subgrupos la tasa de PG es considerablemente alta, aunque de nuevo, el tamaño muestral no fue lo suficientemente alto como para considerar seguros los resultados. Lo que sí parece concluyente es que no existe diferencia entre la tasa de PG obtenida en el grupo control respecto a la del grupo experimental. Además, si observamos los porcentajes de OM en relación con la tasa de PG, vemos que no hay una concordancia entre los resultados obtenidos: una mayor tasa de OM no implica una mayor tasa de PG, lo cual es útil para el veterinario desde un punto de vista clínico, ya que las ovulaciones dobles implican necesariamente la presencia de dos vesículas embrionarias.

Los resultados obtenidos en el *Figura 1* concuerdan con lo descrito en la bibliografía (Bergfelt, 2006; Newcombe *et al.*, 2008), ya que existe una correlación negativa entre el diámetro del folículo dominante y el ITO, esto significa que cuanto mayor es el folículo en el momento de la administración de PGF_{2α}, menos días tarda la yegua en ovular. Esto concuerda con el hecho de que la prostaglandina tipo F tiene un efecto directo sobre la ovulación (Weems, 2006; Ginther *et al.*, 2008) y que, por tanto, induce la ovulación de estos folículos de tamaño mayor a 35-40 milímetros. Por otro lado, otro parámetro del que habíamos hablado anteriormente que podía afectar a tener un intervalo más o menos largo es la dosis de PGF_{2α} empleada. En este caso, no creemos que pueda haber influido porque siempre se usó la misma dosis de luprostiol, que según la bibliografía es de 15 µg/kg (Staempfli, 2011), que equivale a 1 ml de Prosolvin[®], la dosis recomendada por el fabricante (7,5 mg/animal). No obstante, sería útil realizar otro estudio para evaluar si, como en el caso del cloprostenol, el

ITO es dosis-dependiente y puede variar si usamos una dosis más alta o más baja (Newcombe *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

El ITO tiene un efecto directo sobre la TP, siendo mayor la TP cuanto mayor es el ITO. Además, la tasa de OM también aumenta con la administración de PGF, especialmente en ITO más largos, pero a su vez esto no implica un aumento de la misma forma de las gestaciones gemelares. Por último, también se puede concluir que cuanto mayor es el diámetro del folículo dominante en el momento del tratamiento luteolítico, menos tardará en ovular.

Sin duda, el ITO que más conviene desde un punto de vista clínico es el del subgrupo 2B, donde las yeguas ovulan entre 6 y 8 días después del tratamiento con la PGF_{2α}, ya que aunque el subgrupo 2C obtiene mejores tasas de gestación, también hay que pensar que el tiempo es un factor limitante en esta industria, además de que el intervalo del subgrupo 2B es mucho más cerrado que el del 2C; también es más conveniente porque, aunque la tasa de OM es mayor que en el grupo control, en este estudio no se obtuvo ninguna preñez gemelar en este subgrupo, lo cual es muy útil para el veterinario porque reduce la probabilidad de encontrar gemelos, un factor nada deseado en la reproducción equina. No obstante, como hemos dicho antes, conviene analizar este parámetro más en detalle.

Este estudio es interesante desde el punto de vista clínico porque la prostaglandina es una hormona muy utilizada en la reproducción equina, y tiene un efecto directo sobre algo tan importante como es la tasa de preñez. Por tanto, es conveniente seguir investigando sobre este tema para intentar conocer en profundidad las causas y el funcionamiento de la prostaglandina.

BIBLIOGRAFÍA

Allen WR, Rowson LEA. Control of the mare's oestrous cycle by prostaglandins. *J Reprod Fertil* 1973; 33: 539-43.

Asa CS, Goldfoot DA, Garcia MC, Ginther OJ. 1984. The effect of estradiol and progesterone on the sexual behaviour of ovariectomized mares. *Physiol Behav* 1984; 33: 681-86.

Baucus KL, Squires EL, Morris R, McKinnon AO. 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.

Bergfelt DR, Pierson RA, Ginther OJ. Regression and resurgence of the CL following PGF_{2α} treatment 3 days after ovulation in mares. *Theriogenology* 2006; 65 (8): 1605-19.

Coffman EA, Pinto CRF, Snyder HK, Leisinger CA, Cole K, Whisnant CS. Antiluteogenic effects of serial prostaglandin F_{2α} administration in cycling mares. *Theriogenology* 2014; 82 (9): 1241-45.

Crowe CA, Ravenhill PJ, Hepburn RJ, Shepherd CH. A retrospective study of artificial insemination of 251 mares using chilled and fixed time frozen-thawed semen. *Equine Vet J* 2008; 40 (6): 572-76.

Cuervo-Arango J, Newcombe JR. Cloprostenol in equine reproductive practice: something more than a luteolytic drug. *Reprod Domest Anim* 2010; 45 (5): e 8-11.

Dalin AM, Hellström A, Gänheim A, Hagen P. A retrospective study on the effect of prostaglandin and hCG on double ovulation in mares. *Reprod Domest Anim* 2008; 43 (3): 101.

Douglas RH, Ginther OJ. Effects of Prostaglandin F_{2α} on the oestrous cycle and pregnancy in mares. *J Reprod Fert* 1975; Suppl 23: 257-61.

Ferris RA, Hatzel JN, Lindholm ARG, et al. Efficacy of deslorelin acetate (SucroMate) on induction of ovulation in American Quarter Horse mares. *J Equine Vet Sci* 2012; 32 (5): 285-88.

Freeman DA, Woods GL, Vanderwall DK, Weber JA. Embryo-initiated oviductal transport in mares. *J Reprod Fertil* 1992; 75: 535-38.

Ginther OJ. *Ultrasonic Imaging and Reproductive events in the mare*, 1st ed. Cross Plains, Equiservices, 1986.

Ginther OJ. *Reproductive biology of the mare*, 2nd ed. Wisconsin, Equiservices, 1992.

Ginther OJ. *Ultrasonic imaging and animal reproduction. Book 2, horses*. 1st ed. Cross Plains, Equiservices, 1995.

Ginther OJ, Jacob JC, Gastal MO, Gastal EL, Beg MA. Follicle and systemic hormone interrelationships during spontaneous and ablation-induced ovulatory waves in mares. *Anim Repr Sci* 2008; 106 (1-2): 181-87.

Jeffcott LB, Rossdale PD. A critical review of current methods for induction of parturition in the mare. *Equine Vet J* 1977; 9 (4): 208-15.

Katila T. Effects of hormone treatment, season, age and type of mares on ovulation, twinning and pregnancy rates of mares inseminated with fresh and frozen semen. *Pferdeheilkunde* 2003; 19 (6): 619-24.

King SS, Douglas BL, Roser JF, Silvia WJ, Jones KL. Differential luteolytic function between the physiological breeding season, autumn transition and persistent winter cyclicity in the mare. *Anim Repr Sci* 2010; 117: 232-40.

Loomis PR. The equine frozen semen industry. *Anim Reprod Sci* 2001; 68 (3-4): 191-200.

McCracken JA, Carlson JC, Glew MC, Goding JR, Baird DT, Green K, *et al.* Prostaglandin F_{2α} identified as a luteolytic hormone in the sheep. *Nature* 1972; 238: 129-34.

Newcombe JR, Jöchle W, Cuervo-Arango J. Effect of dose of cloprostenol on the interval to ovulation in the dioestrous mare: a retrospective study. *J Equine Vet Sci* 2008; 28 (9): 532–39.

Newcombe JR. Factors affecting fertility rate with use of cooled transported semen. In: Sprayberry KA, Robinson NE, Robinson's current therapy in Equine Medicine, 7th ed. St Louis, Elsevier, 2015; 658-60.

Oxender WD, Noden PA, Bolenbaugh BS, Hafs HD. Control of estrus with prostaglandin F_{2α} in mares: minimal effective dose and stage of estrous cycle. *Am J Vet Res* 1975; 36 (8): 1144-47.

Pike JE. Prostaglandins. *Sci Amer* 1971; 225: 84-92.

Pinto C. The use of prostaglandin F_{2α} (PGF) for controlling the mare's estrous cycle. Communication. Proceedings of the society for Theriogenology 2013 Annual Conference. Louisville, 7-10 August, 2013.

Pycock JF. Therapy for mares with uterine fluid. In: Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO (eds), *Current Therapy in Equine Reproduction*, 1st ed. St Louis, Elsevier, 2007.

Samper JC. Induction of estrus and ovulation: why some mares respond and others do not. *Theriogenology* 2008; 70 (3): 445–47.

Sieme H, Bonk A, Hamann H, Klug E, Katila T. Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology* 2004; 62 (5): 915-28.

Staempfli SA. Prostaglandins. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (eds), *Equine reproduction*, 2nd ed. Iowa, Willey-Blackwell, 2011.

Stout T. Prostaglandins. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (eds), *Equine reproduction*, 2nd ed. Iowa, Willey-Blackwell, 2011.

Vidament M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim Reprod Sci* 2005; 89 (1-4): 115-36.

Weems CW, Weems YS, Randel RD. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Vet J* 2006; 171 (2): 206-28.