



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA

Tesis para acceder al título de Magíster en Producción Equina

**“EFECTOS DEL LAVAJE EMBRIONARIO SOBRE VALORES
SÉRICOS DE PROGESTERONA EN YEGUAS RAZA ÁRABE
DONANTES DE EMBRIONES”**

TESISTA

Rubio, M. Soledad, MV

DIRECTOR:

Mouguelar Horacio, Dr, MV

CODIRECTORA:

Von Meyeren, Micaela, MSc, MV

Río Cuarto, Marzo 2023

Metadatos de la TESIS

- Título completo: “EFECTOS DEL LAVAJE EMBRIONARIO SOBRE VALORES SÉRICOS DE PROGESTERONA EN YEGUAS RAZA ÁRABE DONANTES DE EMBRIONES”
- Autor/es: Apellido, Nombre y Filiación institucional: Rubio, M. Soledad, Sharjah, Emiratos Árabes Unidos.
- Palabras clave: Lavaje uterino/prostaglandinas/luteólisis.
- Resumen en español: Para obtener el máximo número de ciclos a lo largo de la temporada reproductiva, evitar preñeces no deseadas y posibles endometritis, la fase lútea de las yeguas donantes de embriones se acorta tras el lavado uterino para recuperación embrionaria. Esto se consigue tratando a la donante con prostaglandina F2 α (PGF2 α) o sus análogos (PGF), desencadenando la luteólisis y acortando el intervalo interovulatorio (IIO). Algunos autores han sugerido que la manipulación del cuello uterino y/o del útero durante el lavado embrionario puede provocar la liberación endógena de oxitocina y/o PGF2 α , con la consiguiente alteración de la función lútea, disminución de los niveles séricos de progesterona y acortamiento del ciclo estral; mientras que otros reportan ausencia de cambios o incluso la prolongación de la duración del ciclo tras el lavado de recuperación embrionaria. El propósito de este estudio fue el de evaluar los efectos del lavado uterino para recuperación embrionaria en yeguas tratadas y no tratadas con PGF sobre los niveles séricos de progesterona y el intervalo interovulatorio. Se analizaron 26 ciclos correspondientes a 6 yeguas donantes de embriones de Raza Árabe, de 4 a 15 años de edad, durante dos temporadas de cría. Las yeguas fueron inseminadas y a los 8 o 9 días pos ovulación se realizó el lavaje uterino para recuperación embrionaria utilizando Ringer lactato. Tras el lavado, las yeguas se dividieron en 2 grupos: Grupo 1 (n=9) tratado con dl-Cloprostenol y Grupo 2 (n=17) sin tratamiento. Se extrajeron muestras de sangre de cada yegua el día del lavado uterino para recuperación embrionaria y 48 horas después, el suero se almacenó congelado a - 17 °C hasta su análisis mediante un kit ELISA de progesterona (DRG Instruments, Marburg, Alemania). En el presente trabajo se observó una disminución significativa de las concentraciones plasmáticas de progesterona en las yeguas del Grupo 1 (12,08 \pm 3,91 ng/ml en el momento del lavaje uterino para recuperación embrionaria frente a 0,7 \pm 0,28 ng/ml a las 48h, p<0,001), pero no en las del Grupo 2 (12,62 \pm 4,76 ng/ml en el momento del lavaje uterino para recuperación embrionaria frente a 10,89 \pm 3,57 ng/ml a las 48h, p=0,549). El IIO fue más corto en las yeguas del Grupo 1 que en las del Grupo 2 (18,56 \pm 1,94 vs. 20,94 \pm 1,84 días, respectivamente; p=0,006). No se observaron diferencias significativas en el diámetro de los cuerpos lúteos ni en el fluido uterino entre los dos grupos. En base a los resultados obtenidos en este estudio, se determinó que la manipulación del tracto reproductivo durante el lavado uterino para la recuperación embrionaria no resulta en una liberación endógena de PGF2 α que sea suficiente para provocar la luteólisis o causar una disminución significativa de los niveles séricos de progesterona en yeguas donantes de embriones.
- Resumen en inglés: In order to obtain the maximum number of cycles throughout the breeding season, avoid unwanted pregnancies and possible endometritis, the luteal phase of donor mares is shortened after embryo flushing. This is achieved by treating the donor with prostaglandin F2 α (PGF2 α) to induce luteolysis and hence shorten the

interovulatory interval (IOI). It has been suggested that cervix and/or uterus manipulation during embryo flushing may result in endogenous PGF2 α and/or oxytocin release, resulting in altered luteal function, with a consequent decrease in serum progesterone levels and shortening of the oestrous cycle. Other authors have reported no differences in progesterone level nor cycle length following embryo flushing. The aim of this study was to evaluate the effects of embryo flushing with or without administration of PGF2 α on serum progesterone levels and IOI in donor mares. Over two breeding seasons, 26 oestrous cycles of six Arabian donor mares, aged 4 to 15 years were studied. Inseminated mares were flushed on day 8 or 9 post ovulation using lactated Ringer’s solution (LRS) and a standard closed system for embryo flushing technique. After flushing the mares were divided into 2 groups; Group 1 (n=9) were treated with dl-Cloprostenol and Group 2 (n=17) were untreated. Blood samples were collected on the day of embryo flushing and 48h later and the serum was stored frozen until further analysis using a progesterone ELISA kit (DRG Instruments, Marburg, Germany). A significant decrease in plasma progesterone concentrations was observed in Group 1 mares (12.08 ± 3.91 ng/ml at flushing vs 0.7 ± 0.28 ng/ml at 48h, $p < 0.001$) but not in Group 2 (12.62 ± 4.76 ng/ml at flushing vs 10.89 ± 3.57 ng/ml at 48h, $p = 0.549$). The IOI was shorter in Group 1 compared to Group 2 mares (18.56 ± 1.94 vs. 20.94 ± 1.84 days, respectively; $p = 0.006$). No significant differences were observed in the diameter of the corpus luteum (CL) or amount of uterine fluid. Based on the results of this study, manipulation of the reproductive tract during embryo flushing does not result in an endogenous release of PGF2 α sufficient to induce luteolysis or a significant decrease in serum progesterone levels in embryo donor mares.

- Evaluado por pares: **SI**
- Fecha: (30/05/2023)
- Formato: pdf
- Idioma: español.
- Financiamiento: No
- Condiciones de uso: **CC BY-NC-SA**
- Plazo solicitado de embargo: 24 meses

“Informo que, de acuerdo a lo que prescribe la **Ley N° 26.899**^(*) (2013), su Reglamento Operativo (Resolución 753-E/2016) y la Política Institucional de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Río Cuarto (Resolución del Consejo Superior N° 202/2021), ***este documento es resultado del financiamiento total o parcial otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899 y la Política Institucional de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Río Cuarto***”.

JURADO DE TESIS

Cazales Penino, Nicolás; MV, MSc, PhD.

Profesor Asistente, Unidad Académica Reproducción Animal, Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
Director del Laboratorio de Reproducción Equina EQUUS, Maldonado-Uruguay.

Miragaya, Marcelo Horacio, MV, MSc, PhD.

Profesor Titular, Cátedra de Teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

Pietrani, Melina; MV, MSc.

Jefa de Trabajos Prácticos, Reproducción, Instituto Académico Pedagógico de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Nacional de Villa María, Villa María, Córdoba, Argentina.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amigos, por el apoyo incondicional y por alentarme a seguir mis sueños.

A Sofia Kovácsy, por tu amistad y complicidad.

A todo el equipo de Albidayer stud por ayudarme y darme la oportunidad de realizar este proyecto.

A Sheikh Mohammed Bin Saoud Al Qasimi por permitirme realizar este proyecto.

A Twink Allen y Sandra Wilsher por su ayuda con las muestras y por sus consejos.

A mi codirectora Micaela Von Meyeren, por tu apoyo, paciencia e incondicionalidad en este proceso.

A mi director Horacio Mouguelar, por guiarme y ayudarme en este proceso.

A Melina Pietrani por tu inmensa paciencia y ayuda.

A Luis Losinno por tus enseñanzas profesionales y sobre todo personales que sin duda han marcado mi camino

RESUMEN

Para obtener el máximo número de ciclos a lo largo de la temporada reproductiva, evitar preñeces no deseadas y posibles endometritis, la fase lútea de las yeguas donantes de embriones se acorta tras el lavado uterino para recuperación embrionaria. Esto se consigue tratando a la donante con prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) o sus análogos (PGF), desencadenando la luteólisis y acortando el intervalo interovulatorio (IIO). Algunos autores han sugerido que la manipulación del cuello uterino y/o del útero durante el lavado embrionario puede provocar la liberación endógena de oxitocina y/o PGF_{2α}, con la consiguiente alteración de la función lútea, disminución de los niveles séricos de progesterona y acortamiento del ciclo estral; mientras que otros reportan ausencia de cambios o incluso la prolongación de la duración del ciclo tras el lavado de recuperación embrionaria. El propósito de este estudio fue el de evaluar los efectos del lavado uterino para recuperación embrionaria en yeguas tratadas y no tratadas con PGF sobre los niveles séricos de progesterona y el intervalo interovulatorio. Se analizaron 26 ciclos correspondientes a 6 yeguas donantes de embriones de Raza Árabe, de 4 a 15 años de edad, durante dos temporadas de cría. Las yeguas fueron inseminadas y a los 8 o 9 días pos ovulación se realizó el lavaje uterino para recuperación embrionaria utilizando Ringer lactato. Tras el lavado, las yeguas se dividieron en 2 grupos: Grupo 1 (n=9) tratado con dl-Cloprostenol y Grupo 2 (n=17) sin tratamiento. Se extrajeron muestras de sangre de cada yegua el día del lavado uterino para recuperación embrionaria y 48 horas después, el suero se almacenó congelado a - 17 °C hasta su análisis mediante un kit ELISA de progesterona (DRG Instruments, Marburg, Alemania). En el presente trabajo se observó una disminución significativa de las concentraciones plasmáticas de progesterona en las yeguas del Grupo 1 ($12,08 \pm 3,91$ ng/ml en el momento del lavaje uterino para recuperación embrionaria frente a $0,7 \pm 0,28$ ng/ml a las 48h, $p < 0,001$), pero no en las del Grupo 2 ($12,62 \pm 4,76$ ng/ml en el momento del lavaje uterino para recuperación embrionaria frente a $10,89 \pm 3,57$ ng/ml a las 48h, $p = 0,549$). El IIO fue más corto en las yeguas del Grupo 1 que en las del Grupo 2 ($18,56 \pm 1,94$ vs. $20,94 \pm 1,84$ días, respectivamente; $p = 0,006$). No se observaron diferencias significativas en el diámetro de los cuerpos lúteos ni en el fluido uterino entre los dos grupos. En base a los resultados obtenidos en este estudio, se determinó que la manipulación del tracto reproductivo durante el lavado uterino para la recuperación embrionaria no resulta en una liberación endógena de PGF_{2α} que sea suficiente para provocar la luteólisis o causar una disminución significativa de los niveles séricos de progesterona en yeguas donantes de embriones.

ABSTRACT

In order to obtain the maximum number of cycles throughout the breeding season, avoid unwanted pregnancies and possible endometritis, the luteal phase of donor mares is shortened after embryo flushing. This is achieved by treating the donor with prostaglandin F2 α (PGF2 α) to induce luteolysis and hence shorten the interovulatory interval (IOI). It has been suggested that cervix and/or uterus manipulation during embryo flushing may result in endogenous PGF2 α and/or oxytocin release, resulting in altered luteal function, with a consequent decrease in serum progesterone levels and shortening of the oestrous cycle. Other authors have reported no differences in progesterone level nor cycle length following embryo flushing. The aim of this study was to evaluate the effects of embryo flushing with or without administration of PGF2 α on serum progesterone levels and IOI in donor mares. Over two breeding seasons, 26 oestrous cycles of six Arabian donor mares, aged 4 to 15 years were studied. Inseminated mares were flushed on day 8 or 9 post ovulation using lactated Ringer's solution (LRS) and a standard closed system for embryo flushing technique. After flushing the mares were divided into 2 groups; Group 1 (n=9) were treated with dl-Cloprostenol and Group 2 (n=17) were untreated. Blood samples were collected on the day of embryo flushing and 48h later and the serum was stored frozen until further analysis using a progesterone ELISA kit (DRG Instruments, Marburg, Germany). A significant decrease in plasma progesterone concentrations was observed in Group 1 mares (12.08 ± 3.91 ng/ml at *flushing* vs 0.7 ± 0.28 ng/ml at 48h, $p < 0.001$) but not in Group 2 (12.62 ± 4.76 ng/ml at *flushing* vs 10.89 ± 3.57 ng/ml at 48h, $p = 0.549$). The IOI was shorter in Group 1 compared to Group 2 mares (18.56 ± 1.94 vs. 20.94 ± 1.84 days, respectively; $p = 0.006$). No significant differences were observed in the diameter of the corpus luteum (CL) or amount of uterine fluid. Based on the results of this study, manipulation of the reproductive tract during embryo flushing does not result in an endogenous release of PGF2 α sufficient to induce luteolysis or a significant decrease in serum progesterone levels in embryo donor mares.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Ciclo estral	3
1.2	Edema endometrial	4
1.3	Fluido intrauterino	4
1.4	Cuerpo lúteo.....	5
1.5	PGF2 α	6
1.6	Sensibilidad de las yeguas a PGF2 α comparada a otras especies.....	7
1.7	Luteólisis.....	8
1.8	Intervalo tratamiento ovulación	11
1.9	Efecto del lavaje uterino y/o la manipulación cervical sobre el ciclo estral.....	11
2	HIPÓTESIS.....	13
3	OBJETIVOS.....	13
3.1	Objetivo general.....	13
3.2	Objetivos específicos	13
4	MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1	Animales	14
4.2	Drogas y soluciones utilizadas.....	14
4.3	Diseño experimental	14
4.4	Lavaje uterino para recuperación embrionaria	15
4.5	Medición de niveles de progesterona.....	17
4.6	Tamaño del cuerpo lúteo.....	18
4.7	Edema endometrial	18
4.8	Fluido intrauterino	19
4.9	Intervalo tratamiento ovulación (ITO).....	20
4.10	Intervalo Inter Ovulatorio (IIO).....	21
4.11	Análisis estadístico	21
5	RESULTADOS.....	22
5.1	Medición de niveles de progesterona.....	22
5.2	Tamaño del cuerpo lúteo.....	22
5.3	Edema endometrial	23
5.4	Fluido intrauterino	23
5.5	Intervalo tratamiento Ovulación (ITO).....	23
5.6	Intervalo Inter Ovulatorio (IIO).....	24
6	DISCUSIÓN.....	25

“Efectos del lavaje embrionario sobre valores séricos de progesterona en yeguas raza árabe donantes de embriones” MV. Rubio, M. Soledad.

7	CONCLUSIONES	29
8	REFERENCIAS	30

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Ciclo estral de la yegua relacionado a la actividad ovárica y concentración de hormonas circulantes.....	4
Figura 2. Comparación de la relación espacial entre la vena útero-ovárica y la arteria ovárica	7
Figura 3. Representación gráfica de la media \pm SEM de la concentración de progesterona sérica en yeguas	9
Figura 4. Concentraciones de PGF2 α (pg/ml) y progesterona (P4, ng/ml) durante la preluteólisis, luteólisis y postluteólisis, centralizadas en la hora de transición (hora 0) entre preluteólisis y luteólisis.	10
Figura 5. Diseño experimental.....	15
Figura 6. Tipos de sondas Foley utilizadas para el lavaje embrionario, medidas CH 32 y CH 28.....	16
Figura 7. A. Equipo de flushing completo. B. Sonda Foley con balón completamente insuflado. C. Imagen representativa del balón insuflado ubicado en el cuerpo uterino.	17
Figura 8. Imagen representativa de la metodología utilizada para la medición de CL, tomada con el ecógrafo MyLab TM OneVET, Easote.	18
Figura 9. Imágenes representativas de la escala utilizada para clasificar el edema uterino.	19
Figura 10. Imágenes representativas de la graduación de fluido uterino.	20
Figura 11. Dosaje de progesterona sérica a las 0h y 48h posteriores al lavaje embrionario para ambos grupos	22
Figura 12. Tamaño de los CL a las 0h y 48h posteriores al lavaje embrionario para ambos grupos	23
Figura 13. Duración del ITO en días para el grupo 1 y 2	24
Figura 14. Duración del IIO en días para el grupo 1 y 2	24
Tabla 1. Graduación utilizada para clasificar la presencia / ausencia de fluido uterino.....	19

ABREVIATURAS

CL: Cuerpo Lúteo

cm: centímetros

DS: Desvío Estándar

IIO: Intervalo Interovulatorio

ITO: Intervalo Tratamiento Ovulación

ml: Mililitros

mm: Milímetros

P₄: Progesterona

PGF: Análogos de prostaglandina F₂α

PGF₂α: Prostaglandina F₂α

PGFM: metabolitos de PGF

RL: Ringer Lactato

SPC: Sangre Pura de Carrera

TE: Transferencia Embrionaria

1 INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones (TE) en equinos fue reportada por primera vez en los años 70' (Allen & Rowson, 1972,1975; Oguri & Tsutsumi, 1974) y no fue hasta la década del 90' que alcanzó la escala comercial. Este retraso en la adopción a gran escala de la técnica es remarcable en comparación con otras especies. Algunas de las causas se pueden resumir en la consideración inicial de esta técnica como un procedimiento esotérico, con pocas posibilidades de aplicación comercial, incluso dentro de la industria de los caballos deportivos que no eran sangre pura de carrera (SPC). Mientras que la renuencia inicial de la industria de la cría de caballos a adoptar la TE se debió en parte a limitaciones prácticas (uno de los principales cambios en la transferencia de embriones equinos fue la capacidad de almacenar embriones a 5°C y enviarlos a una estación centralizada para transferirlos a yeguas receptoras) (Squires et al., 1999) , la aceptación del método no se vio favorecida debido a temores infundados, de que el rendimiento atlético de los potros producto de la TE se vería influenciado por las capacidades de su madre sustituta y el conservadurismo burocrático (Stout, 2006).

La TE finalmente logró una escala comercial a principios de 1990 en Argentina, donde se desarrolló como una alternativa para obtener descendencia de las mejores yeguas de raza Polo Argentino, aprovechando una de sus mayores ventajas, evitar finalizar o interrumpir las competencias deportivas de las donantes. Con el uso de esta técnica se pudo obtener descendencia de yeguas que eran vendidas a otros países en el pico de su carrera (Pashen et al., 1993; Riera and McDonough 1993). Además, muchos registros genealógicos flexibilizaron las reglas que prohibían el registro de potros de TE o limitaba el registro a un potro por madre genética por año, lo que ayudó a disipar algunos de los temores iniciales.

En sus comienzos, los embriones eran transferidos de manera quirúrgica en el cuerno uterino de la yegua receptora (Squires et al., 1982), pero rápidamente se hizo evidente que los embriones equinos podían transferirse con éxito similar, sin cirugía y con mejores resultados (Wilsher & Allen, 2004), utilizando una técnica aséptica y no traumática a través del cuello uterino en una yegua en diestro. De esta manera, la TE equina pudo instalarse como una herramienta biotecnológica con amplios beneficios.

La TE permite recolectar un embrión a través de un lavaje uterino transcervical de una yegua donante (previamente inseminada o servida naturalmente), 6 a 10 días posteriores a la

ovulación. El embrión recuperado es transferido al útero de una yegua receptora, previamente sincronizada con la donante, teniendo como principal objetivo de esta técnica, que la donante no lleve a cabo la gestación y sea la receptora la que asegure este proceso. La TE es una potente biotecnología reproductiva debido a que permite obtener: a) más de una cría por yegua por año, disminuyendo el intervalo generacional b) embriones de yeguas gerontes, que serán transferidos a receptoras jóvenes con un mejor ambiente y calidad uterina, c) embriones de yeguas subfértiles, d) embriones de yeguas en competición, y e) adelantos en la mejora genética debido a la posibilidad de utilizar diferentes sementales de alto valor genético en un mismo año (Squires et al., 1999; Vanderwall & Ball, 2000; Hartman, 2011).

Al comenzar cada temporada reproductiva, los programas de TE son sometidos a diferentes desafíos en búsqueda de lograr mejores resultados por donante. Con la finalidad de obtener un mayor número de ciclos a lo largo de la temporada reproductiva y evitar preñeces no deseadas, la fase lútea de la donante se acorta luego del lavaje embrionario (día 6 a 9,5). La donante es tratada con prostaglandina F2 α (PGF2 α) o sus análogos (PGF), para reducir el intervalo interovulatorio (IIO), buscando disminuir así el tiempo hasta la próxima oportunidad de obtener un embrión. En la mayoría de los casos la PGF es administrada de rutina el día del lavaje uterino, posteriormente al mismo, lo que ocasiona una disminución en los niveles séricos de progesterona a valores inferiores a 1ng/ml (Ginther & Beg, 2012). De esta manera las yeguas retornan al estro en un periodo de tiempo inferior al que lo harían si no fueran tratadas con PGF. La utilización de PGF con la finalidad de inducir luteólisis y adelantar el estro es la práctica farmacológica más común en la manipulación del ciclo estral.

La PGF2 α y sus análogos son utilizados ampliamente en la clínica reproductiva equina para modificar situaciones fisiológicas o patológicas, donde es necesario acortar el diestro. Por ejemplo, para el tratamiento de un diestro prolongado, para reducir el intervalo del diestro en yeguas que no fueron inseminadas o se infectaron en el celo anterior, para sincronizar la ovulación para la TE, para estimular las contracciones uterinas en el caso de fluido uterino y en el tratamiento de la endometritis. Además, la PGF2 α se utiliza para inducir el aborto y el parto (Nagel & Aurich, 2022), o como posible tratamiento para yeguas que rechazan a sus potros (Barker et al., 2019). El uso de PGF es rutinario en la clínica reproductiva como agente luteolítico, aunque previo a esto, la infusión con solución salina era utilizada con el mismo fin (Ginther & Meckley, 1972).

Diversos estudios analizaron la liberación de PGF2 α en las hembras receptoras a las que son transferidos los embriones, identificando este evento como una causa posible de fallo del establecimiento de preñez (Cuervo-Arango et al., 2018). La liberación de PGF2 α podría ser el resultado de la manipulación cervical y/o uterina (Koblischke et al., 2008a), aunque se desconoce si la manipulación uterina y/o cervical en la yegua donante es capaz de provocar la luteólisis *per se*. Debido a este interrogante, el presente trabajo se centró en aportar datos sobre los efectos del lavaje uterino en los valores séricos de progesterona en yeguas donantes de embriones de raza árabe. El estudio de la manipulación cervical y/o uterina sobre la liberación de PGF2 α endógena y su efecto sobre el ciclo estral es de importancia para poder desarrollar nuevos protocolos que permitan acortar el IIO y obtener resultados más eficaces en la manipulación del ciclo.

Hasta el momento no se ha identificado si el proceso de lavaje uterino para la recuperación embrionaria en la yegua donante de embriones es capaz de causar luteólisis en la misma. La finalidad de este estudio es evaluar el efecto del lavaje uterino sobre los valores plasmáticos de progesterona y sus efectos sobre el ciclo estral de la hembra donante de embriones.

1.1 Ciclo estral

El ciclo estral es el periodo que se extiende entre 2 ovulaciones consecutivas y posee 2 fases bien definidas. La fase folicular, tiene una duración media de 7.6 días (± 1.8) con un rango de 2 a 12 días (Ginther & Pierson, 1989) y se caracteriza por presencia de un folículo dominante, edema endometrial, receptividad al padrillo, y ausencia de CL activo (Samper, 2008). La fase lútea tiene una duración media de 13.5 días (± 1.6) con un rango de 12 a 16 días y se caracteriza por ausencia de edema endometrial, sin receptividad al padrillo, presencia de un CL visible, activo y niveles de P4 ≥ 1 ng/ml. Estos parámetros permiten identificar fácilmente la fase reproductiva en la que se encuentra la yegua, debido a los cambios típicos que ocurren en el tracto reproductivo. La duración media de un ciclo estral o de un IIO, suele ser de 22 o 24 días en caballos y ponis respectivamente (Ginther & Pierson, 1989), aunque pueden tener una duración de 16 a 25 días. Esta gran variación en el IIO (16-25 días) parece deberse a diferencias en la duración del estro en lugar del diestro, que en general es constante.

La fase lútea del ciclo estral de la yegua es dominada por la presencia de la hormona progesterona. Esta fase comienza luego de la ovulación (Fig. 1), con el aumento de los valores plasmáticos de progesterona, por encima de 1 ng/ml y finaliza con la luteólisis. Este

evento comprende la regresión del CL y la caída de las concentraciones plasmáticas de progesterona por debajo de 1 ng/ml. Estos sucesos son mediados por la acción de la PGF2 α liberada desde el endometrio (Weems et al., 2006).

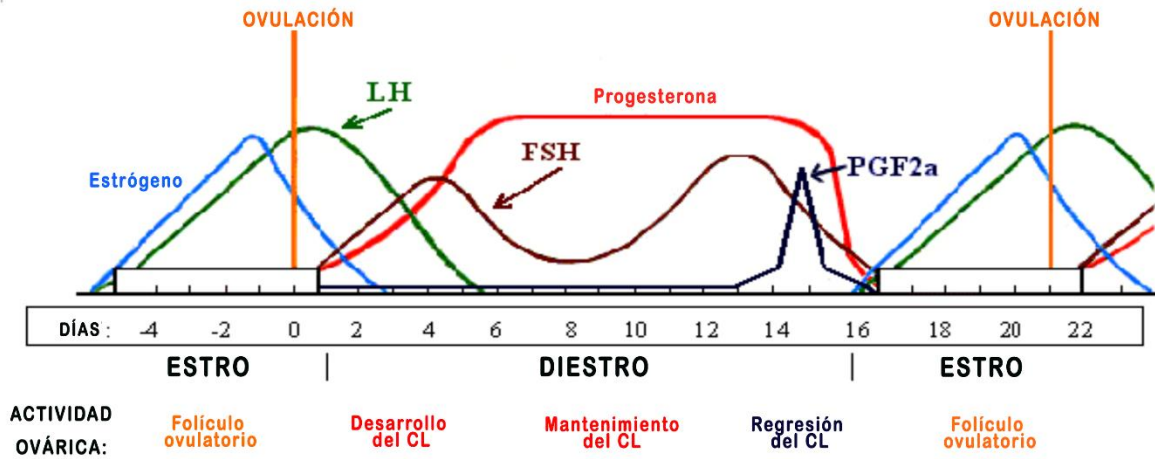


Figura 1. Ciclo estral de la yegua relacionado a la actividad ovárica y concentración de hormonas circulantes. Adaptado de equine-reproduction.com (Estrous Cycle in the Mare • Equine-Reproduction.Com, LLC, n.d.).

1.2 Edema endometrial

La perfusión de sangre al útero de la yegua aumenta bajo la influencia de los estrógenos, lo que resulta en el edema endometrial (Samper, 2007). La presencia o ausencia de edema endometrial, fisiológico en la fase folicular del ciclo estral, es un evento progresivo que está asociado con valores de estrógenos crecientes, producidos por el folículo dominante en desarrollo y niveles basales de progesterona (McCue et al., 2011). Existe una apariencia típica del útero con edema durante el estro, que es el llamado patrón de “rueda de carro” o “rodaja de naranja” (Samper, 2010). Este patrón se desarrolla gradualmente en los pliegues endometriales durante varios días, alcanzando su pico 2 días antes de la ovulación para luego disminuir hasta desaparecer el día de la ovulación o primer día del diestro (Ginther & Pierson, 1984a). En diestro, a la ecografía, el útero posee un aspecto tubular, ecográficamente homogéneo y no debería presentar edema (Ginther & Pierson, 1983, 1984a). La presencia de edema durante el diestro es patológica y puede indicar procesos inflamatorios y/o infecciosos (Samper, 1997).

1.3 Fluido intrauterino

Una de las manifestaciones clínicas más importantes de endometritis es la presencia de fluido intrauterino. La endometritis es la inflamación y/o infección del endometrio (Canisso et al., 2020) y puede clasificarse en aguda, crónica o endometritis post-servicio (EPS) (LeBlanc, 2010). La presencia de fluido intrauterino >2 cm en estro o hasta 48 h posteriores a la

inseminación, son indicadores de que la yegua es susceptible a endometritis persistente post servicio (Brinsko et al., 2003). Mientras que la presencia de fluido uterino en diestro representa un proceso inflamatorio en el endometrio (Adams et al., 1987).

1.4 Cuerpo lúteo

El ovario equino es único en comparación con el de otros mamíferos domésticos, ya que posee una fosa de ovulación y una ubicación invertida de su corteza y médula (Kimura et al., 2005). Debido a la anatomía específica del ovario, el CL de la yegua se desarrolla dentro de la corteza del ovario y no sobresale hacia la superficie como en otras especies. El CL es una glándula endocrina transitoria que se origina luego de la ovulación de un folículo dominante (Niswender et al., 2000). Surge a partir de la luteinización de las células de la granulosa principalmente (Broadley et al., 1994) y progresa a través de diferentes estadios durante el ciclo estral: desarrollo, madurez y regresión (da Costa et al, 2005). En general, las células de la teca foliculares comienzan a degenerar justo antes de la ovulación, y completan este proceso en 24 horas después, junto con la evacuación del líquido folicular y el colapso de la pared. En consecuencia, las células de la granulosa del folículo se transforman de células secretoras de estrógeno a células lúteas secretoras de progesterona (Bergfelt y Adams, 2011).

La secreción de progesterona termina con el comportamiento estral, promueve la quiescencia uterina y mantiene a la yegua en un estado de no receptividad sexual, preparando el útero para la posible llegada de un embrión desde el oviducto (Cracken et al., 1999). Si se establece una preñez, el CL se mantiene y continúa produciendo progesterona. En el caso de que no ocurra fertilización o que la señalización embrionaria para el reconocimiento materno de la gestación sea insuficiente, el CL regresa. La regresión lútea (luteólisis) elimina la retroalimentación negativa de la progesterona sobre la liberación de gonadotropina por parte del centro cíclico, lo que permite la ovulación de un nuevo folículo, dando así una nueva oportunidad de establecer una preñez. La pérdida de secreción de progesterona por parte del CL (regresión funcional) ocurre antes de la regresión morfológica (Aurich, 2011).

Una vez que el CL ha adquirido capacidad luteolítica, el desenlace de la luteólisis dependerá de la concentración de PGF₂ α y del patrón de pulsatilidad al que estará expuesto (Pate, 2018). Una sola dosis exógena luteolítica de PGF₂ α administrada por vía intramuscular o subcutánea es suficiente para inducir la luteólisis, si se administra al menos 5 días posteriores a la ovulación (Coffman y Pinto, 2016).

1.5 PGF2 α

Las prostaglandinas pertenecen a un grupo de ácidos grasos de cadena larga modificados que contienen átomos de 20 carbonos llamados eicosanoides, son moléculas lábiles que se inactivan durante su paso por la circulación pulmonar (Piper et al, 1970). La vía de la ciclooxigenasa utiliza la enzima prostaglandina sintetasa para convertir ácido araquidónico en prostaglandinas. Existen 2 isoformas de prostaglandina sintasa: una constitutiva (ciclooxigenasa-1) y una inducible (ciclooxigenasa-2). El ácido araquidónico está disponible a través de la hidrólisis de los fosfolípidos presentes en la membrana celular. La descomposición de los fosfolípidos de membrana es catalizada por la enzima fosfolipasa A.

Las prostaglandinas fueron descritas por primera vez en 1930 (Kuzrock & Lieb, 1930) como componentes del plasma seminal y son producidas de manera ubicua en el organismo. Desempeñan papeles críticos en una amplia y diversa gama de procesos fisiológicos y patológicos (contracción del músculo liso, vasodilatación y vasoconstricción, inducción de dolor y fiebre). En cuanto a las funciones reproductivas, tienen un papel importante en la regulación de la fisiología ovárica y uterina durante el ciclo estral, ovulación, preñez y parto (Shrestha et al., 2012). La primera función descubierta en la reproducción fue su capacidad de causar luteólisis, siendo todavía la que posee mayor relevancia clínica.

La PGF2 α es secretada por el endometrio en ausencia de preñez en animales domésticos, finalizando así la fase lútea del ciclo estral. En 1972 Douglas y Ginther , publicaron el primer reporte del efecto luteolítico de la PGF2 α en yeguas y, posteriormente, la utilización de análogos de PGF2 α para acortar, no solo el diestro, sino también el IIO (Allen y Rosedale 1973; Allen et al, 1974).

El principal metabolito de PGF2 α en el plasma de la yegua es 13,14-dihydro-15- keto-PGF2 α (PGFM) mientras que el metabolito predominante en orina es 11-ketotetranor PGF (Goff et al., 1984). Debido a la rápida biosíntesis y a la corta vida media de la PGF2 α a menudo se utiliza PGFM para representar las concentraciones circulantes de PGF2 α (Ginther et al., 2009b). El PGFM es biológicamente inactivo, ya que no hay diferencia en la función lútea cuando es administrado a yeguas (Vanderwall et al, 1999).

En la actualidad las drogas comerciales más utilizadas son el Cloprostenol (250 μ g totales - PGF) y el Dinoprost (5 a 10 mg totales – PGF2 α) (Coffman & Pinto, 2016). Usualmente son aplicadas a yeguas luego del día 5 pos ovulación, logrando una reducción en la concentración de progesterona a niveles basales (<1ng/ml) en un período de 36 h comprobado para el

Dinoprost (Bergfelt et al., 2006). Las vías de administración pueden ser intramuscular, endovenosa, intrauterina, subcutánea e intraluteal. Sin embargo, la vía de elección es la intramuscular, ya que es la que presenta menos efectos colaterales adversos (Miller et al., 1976; Weber et al., 2001).

Debido a la evidencia inicial de que la administración de PGF2 α exógena induce efectivamente luteólisis y el retorno al estro, su uso se ha convertido en uno de los métodos más comunes de manipulación farmacológica del ciclo estral en yeguas, siendo fundamental en la práctica equina reproductiva.

1.6 Sensibilidad de las yeguas a PGF2 α comparada a otras especies

Entender la luteólisis requiere una comprensión de las relaciones anatómicas entre el ovario, el útero y la vasculatura asociada. La PGF2 α es secretada de manera pulsátil por el endometrio, pero el paso desde el útero hacia el CL difiere profundamente entre yeguas y rumiantes. La PGF2 α es transportada desde el útero hacia el ovario, local y unilateralmente en el caso de las vacas y ovejas, o sistémicamente en el caso de las yeguas (Ginther, 2009). Al no existir una vía unilateral en la yegua, la arteria ovárica es menos tortuosa y la superficie de la arteria no tiene mayor contacto con la superficie uterina o la vena útero-ovárica (Ginther, 2012) (Fig. 2).

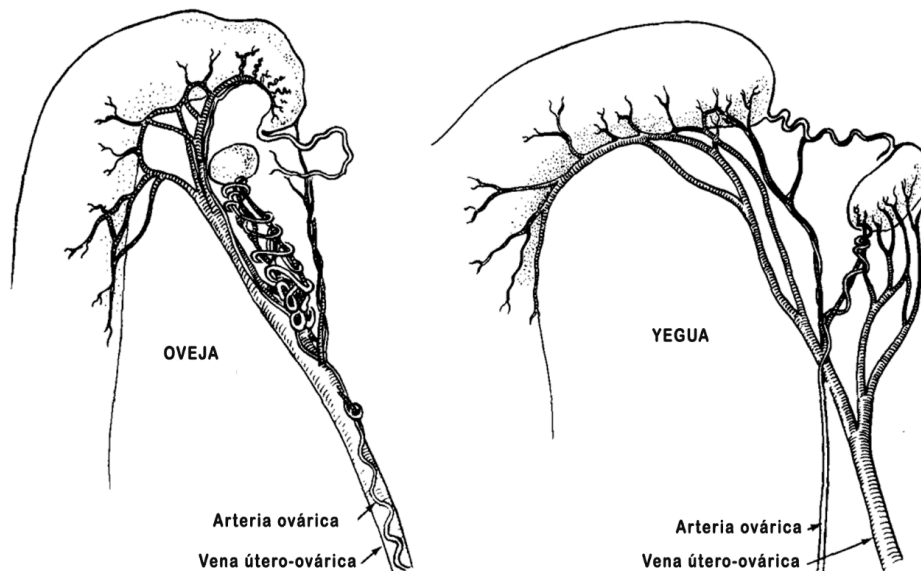


Figura 2. Comparación de la relación espacial entre la vena útero-ovárica y la arteria ovárica en una especie (izquierda- oveja) que tiene una vía útero ovárica unilateral frente a la anatomía de la yegua (derecha) que posee una vía sistémica. Adaptado de Ginther, 1974.

En cuanto a la administración de PGF2 α exógena, en las yeguas la dosis intrauterina e intramuscular son iguales (Ginther et al., 2009a), en contraposición a lo que sucede en las vacas donde la dosis intrauterina es aproximadamente 20 veces menor en comparación a cuando es administrada sistémicamente (Shrestha et al., 2012). La mínima dosis efectiva de PGF2 α en yeguas es 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (1.25 mg), en ovejas 144 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (6 mg totales) y en vacas 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (15-25 mg totales) (Shrestha et al., 2012). Lo que demuestra una mayor sensibilidad de las yeguas comparada a otras especies al efecto de la PGF2 α .

La membrana de las células del CL en la yegua son aproximadamente 10 veces más sensibles a las moléculas de PGF2 α comparada con las vacas (Ginther & Beg, 2012). Esta mayor sensibilidad lútea se atribuye, al menos en parte, a una depuración metabólica más lenta de la PGF2 α . La vida media es de alrededor de 94 segundos en yeguas comparada con los 29 segundos de vida media en vacas. De esta manera, las células de la membrana lútea de los equinos poseen una mayor afinidad a la PGF2 α , y requieren de una menor dosis efectiva para lograr la luteólisis (Shrestha et al., 2012). Estas características les servirían a las yeguas para evadir los efectos no deseados de la PGF2 α como pueden ser comportamiento de cólico, diarrea y sudoración (Irvine et al., 2002).

1.7 Luteólisis

La luteólisis es el proceso en el cual cambios funcionales y estructurales culminan en la degradación rápida y, finalmente, en la completa desaparición del CL y con esto el cese de producción de progesterona. La regresión lútea se debe a la secreción de PGF2 α en varios pulsos secuenciales (dos a cuatro pulsos, cada 8 a 9 h) secretada por el útero no gestante (Ginther, 2012). El fin de la luteólisis (natural o farmacológica) sucede cuando las concentraciones de progesterona descienden a $< 1 \text{ ng/ml}$ (Castro et al., 2021).

La luteólisis en la yegua tiene una duración aproximada de $22.9 \pm 0.9 \text{ h}$ (Ginther et al., 2011) en contraste con los 2 días que se creían que eran necesarios previamente (Townson et al., 1989). En los estudios previos las muestras de sangre eran recolectadas cada 6, 12 o 24 horas (Townson et al., 1989; Ginther et al., 2006; Ginther, Utt, et al., 2007), a diferencia del trabajo de Ginther et al, en 2011, donde los muestreos se realizaron cada 1 hora desde el día 12 post ovulación hasta el día 16. De esta manera, se pudo establecer que el intervalo que se reportaba desde la ovulación hasta el principio y fin de la luteólisis no era preciso (Fig. 3).

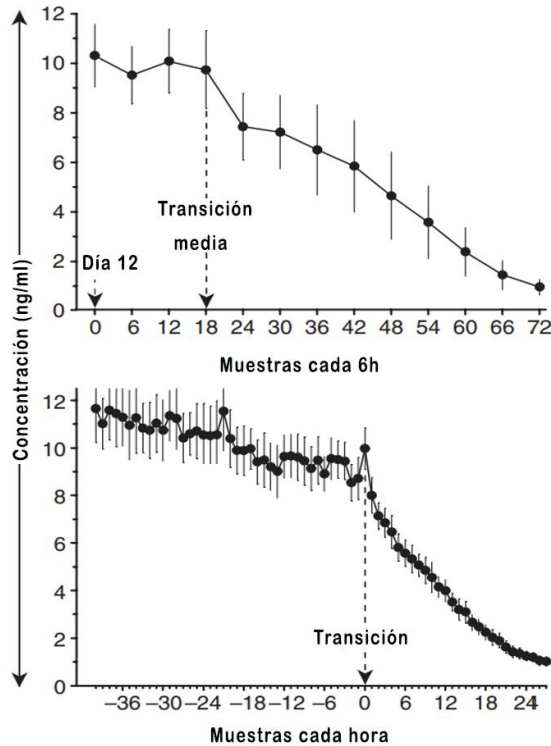


Figura 3. Representación gráfica de la media \pm SEM de la concentración de progesterona sérica en yeguas. En el panel superior se observa el registro de la concentración tomada cada 6 horas, luego del día 12 post-ovulación. El panel inferior muestra las variaciones en la concentración de progesterona medida cada 1 hora, el cual ofrece una representación más adecuada de los cambios esteroidogénicos asociados a la luteólisis. Adaptado de Ginther, 2012.

La luteólisis ha sido dividida en 3 etapas, preluteólisis, luteólisis y posluteólisis (Fig.4). El periodo preluteolítico ocurre antes de la regresión del CL (comprende los días 8 a 14 del ciclo estral), donde las concentraciones de metabolitos de PGF (PGFM) son bajas. La luteólisis es el período donde comienza la regresión funcional del cuerpo lúteo hasta que la progesterona ha disminuido por debajo de un umbral (< 1 ng/ml). El periodo posterior a la luteólisis, cuando los valores de progesterona son < 1 ng/ml, se denomina posluteólisis (Ginther et al., 2008; Ginther, Hannan, et al., 2011; Ginther, 2012; Ginther & Beg, 2012).

La hora de transición (hora 0) se refiere a la hora que marca el final de la preluteólisis e inicio de la luteólisis, y se selecciona subjetivamente mediante la inspección del perfil de P_4 para cada animal. En este momento inicia la disminución progresiva de los valores plasmáticos de P_4 y el aumento de las concentraciones de PGFM (Ginther & Beg, 2012). Esta transición ocurre en promedio al día 14 posterior a la ovulación o 9 días antes de la siguiente ovulación, y tiene una duración aproximada de 22 ± 0.9 horas (Ginther & Beg, 2012).

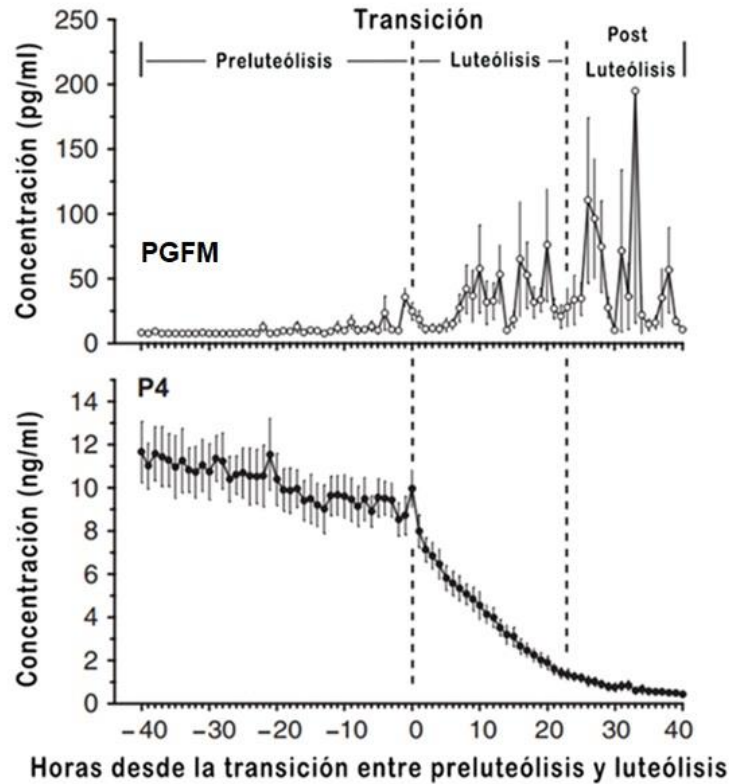


Figura 4. Concentraciones de PGFM (pg/ml) y progesterona (P₄, ng/ml) durante la preluteólisis, luteólisis y postluteólisis, centralizadas en la hora de transición (hora 0) entre preluteólisis y luteólisis. Adaptado de Ginther, 2011.

Desde el día 0 (día de la ovulación) hasta el día 6 del ciclo, la P₄ aumenta rápidamente, para luego disminuir gradualmente después de los días 6 a 8 hasta alrededor del día 13,1 ($\pm 0,4$), dando comienzo a la luteólisis. Las concentraciones medias de P₄ disminuyen gradualmente durante la preluteólisis, pero durante la luteólisis y postluteólisis disminuye de manera exponencial (Ginther, Hannan, et al., 2011). El final de la luteólisis, día en que las concentraciones medias de P₄ disminuyen a $< 1,0$ ng/ml, es el día 15,4 ($\pm 0,3$) (Castro et al., 2021).

La luteólisis es un mecanismo muy importante en la clínica reproductiva, como base para diagnosticar patrones de ciclicidad, además de monitorear, tratar, controlar y manipular el ciclo estral. El diagnóstico clínico de luteólisis es realizado fácilmente mediante palpación y ecografía transrectal, observando presencia de edema endometrial, y disminución del tono uterino y cervical. Además, se evidencia el comportamiento de celo de la yegua, debido al aumento de los niveles de estrógenos que ocurren luego de la disminución del nivel P₄ (< 1 ng/ml). Por último, la medición de la concentración de progesterona sérica o plasmática es el método de elección para estimar funcionalidad de CL (Bergfelt & Adams, 2011).

1.8 Intervalo tratamiento ovulación

El intervalo tratamiento ovulación es el intervalo de tiempo transcurrido desde un tratamiento hasta la siguiente ovulación, el tratamiento más utilizado es la PGF, y es un parámetro muy variable en la yegua. Los intervalos desde la administración de PGF hasta el retorno inicial al estro y la ovulación posterior son de 3 a 4 días y de 6 a 12 días, respectivamente (Burden et al., 2015). En general, el intervalo medio hasta la ovulación después de la administración de cloprostenol a yeguas en diestro fue de $8,4 \pm 2,5$ días (Burden et al., 2015) y un rango de 2 a 16 días (Lofstedt, 1988), encontrándose una correlación inversa entre el diámetro del folículo en el momento del tratamiento y el intervalo posterior a la ovulación (Newcombe et al., 2008). Los intervalos que poseen una menor duración están asociados a folículos diestrales de gran diámetro (>35 mm) (Loy et al., 1979) y pueden ovular dentro de 48 h pos tratamiento con PGF. Diversos estudios han demostrado que yeguas con un intervalo desde la administración de PGF hasta la siguiente ovulación es de menor duración (<6 días) presentan menores tasas de recuperación embrionaria (Pietrani et al., 2019) y menores tasas de preñez (Cuervo-Arango et al., 2015; Mateu-Sánchez et al., 2016). Estos hallazgos demuestran que la fertilidad fue menor cuando el intervalo fue de una menor duración.

1.9 Efecto del lavaje uterino y/o la manipulación cervical sobre el ciclo estral

La información presente en la literatura sobre el efecto del lavaje uterino y/o la manipulación cervical en la duración de la fase lútea del ciclo estral es confusa. Antes de que la $PGF2\alpha$ fuera identificada como la luteolisina uterina, se utilizaba el lavaje uterino con solución salina para acortar el IIO produciendo luteólisis prematura. Estudios controlados demostraron que la infusión intrauterina de solución salina acortó el ciclo estral en yeguas, interrumpiendo la actividad lútea cuando la infusión se realizó a mitad del diestro (Ginther y Meckley 1972). Neely et al. (1974), realizaron un experimento donde se infundió el útero de 10 yeguas con solución salina en el día 6 o 7 pos ovulación; siete yeguas tuvieron un IIO más corto y tres no respondieron, debido a la ocurrencia de una ovulación en diestro cerca del momento de la infusión. Arthur (1975), estudió el efecto de la infusión uterina con solución salina sobre la función reproductiva. En su estudio, las yeguas infundidas entre los días 5 y 9 pos ovulación regresaron al celo en promedio 3 a 8 días antes de lo esperado, y las infusiones durante el diestro fueron seguidas por ciclos ovulatorios de fertilidad normal. La infusión de solución salina en diestro provocó una liberación inmediata de $PGF2\alpha$. Similar

“Efectos del lavaje embrionario sobre valores séricos de progesterona en yeguas raza árabe donantes de embriones” MV. Rubio, M. Soledad.

a lo reportado en otro estudio, las concentraciones de progesterona disminuyeron rápidamente en relación con la liberación de prostaglandinas (Neely et al., 1979).

Desde la década de los 70' se ha propuesto que técnicas transcervicales como la biopsia uterina, el cultivo de endometrio e infusiones uterinas alteran la duración del ciclo debido a un efecto en el cuerpo lúteo (Hurtgen & Whitmore, 1978; Hurtgen & Ganjam, 1979) . Se ha reportado liberación de prostaglandinas y/o una reducción en las concentraciones de progesterona después de procedimientos transcervicales de transferencia de embriones (Sirois, et al.,1987; Kask et al., 1997; Koblichke et al. 2008; DeLuca et al. 2011) o como consecuencia de la dilatación cervical en yeguas en diestro (Handler et al., 2003).

2 HIPÓTESIS

El procedimiento de lavaje uterino con Ringer Lactato (RL) para la recuperación de embriones en yeguas donantes de raza árabe no induce la luteólisis.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del lavaje uterino con RL para recuperación embrionaria sobre los valores séricos de progesterona y sobre la duración de la fase lútea del ciclo estral, en yeguas donantes de embriones de raza árabe.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar las concentraciones de progesterona plasmática el día del lavaje uterino para recuperación embrionaria y a las 48 horas posteriores.
- Analizar diversos parámetros reproductivos pos lavaje: diámetro del cuerpo lúteo, edema uterino, fluido uterino, ITO e IIO.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales

Se utilizaron 26 ciclos correspondientes a 6 yeguas de raza Árabe de show donantes de embriones en un sistema comercial ubicado en Sharjah, Emiratos Árabes Unidos, latitud 25°17'55.9"N 55°34'27.5"E. Las yeguas tenían edades comprendidas entre los 4 y 15 años de edad y 450 a 500 Kg de peso vivo. Se utilizaron los ciclos de 2 temporadas reproductivas 2018-2019 y 2019-2020 durante los meses de noviembre a mayo de cada temporada. Antes de ser incorporadas a alguno de los grupos de estudio las yeguas debían presentar un cultivo endometrial negativo y no presentar patologías que pudiesen causar dolor agudo o crónico.

Durante el periodo de muestreo las yeguas fueron evaluadas por palpación rectal y ultrasonografía, con un ecógrafo MyLab™OneVET, Esaote, equipado con una sonda lineal de 6 a 10 Mhz. En el momento en que se detectó la presencia de folículos ≥ 35 mm, edema uterino y comportamiento de estro, se indujo la ovulación con 1.5 mg de acetato de deslorelina vía intramuscular. Posteriormente fueron inseminadas artificialmente con semen fresco, refrigerado o congelado, dependiendo de la asignación particular de cada yegua. Una vez detectada la ovulación las yeguas fueron monitoreadas mediante ultrasonografía hasta 3 días pos ovulación controlando presencia de fluido intrauterino.

Durante este estudio no se requirió la utilización de sedación, terapia antibiótica y/o antiinflamatoria. Todos los procedimientos fueron realizados por el mismo operador.

4.2 Drogas y soluciones utilizadas

Para los procedimientos de esta tesis se utilizó acetato de deslorelina (Desloreline Acetate SPC. 1.5 mg IM), para inducir la ovulación y Cloprostenol (Estrumate®, 250 µg, IM) para inducir luteólisis. Se utilizó una solución comercial de Ringer Lactato pH 6.5, compuesto por 6g/L de cloruro de sodio, 3.1g/L de lactato de sodio, 0.3g/L de cloruro de potasio, 0.2 g/L de cloruro de calcio (WellPharma Medical Solution LLC) para los lavajes uterinos.

4.3 Diseño experimental

Al día 8 o 9 pos ovulación las yeguas donantes de embriones fueron colocadas en una manga ginecológica y revisadas por palpación rectal y ultrasonografía. Se registró la presencia y grado de fluido intrauterino, edema endometrial, presencia, cantidad y diámetro de cuerpos lúteos, y se extrajo sangre para la medición de los niveles de progesterona. Este momento fue considerado como tiempo 0.

Al finalizar el lavaje uterino las yeguas fueron divididas al azar, en 2 grupos de tratamientos:

- Grupo 1: yeguas en las que al finalizar el lavaje uterino **SI** se administró PGF. Se utilizaron 9 ciclos en total.
- Grupo 2: yeguas en las que al finalizar el lavaje uterino **NO** se les administró PGF. Se utilizaron 17 ciclos en total.

En los ciclos en los cuales se administró PGF, las yeguas recibieron 250 µg (1 ml) de Cloprostenol, intramuscular.

Las yeguas fueron nuevamente evaluadas 48 horas posteriores al lavaje embrionario, donde se registraron los valores previamente descritos. Posteriormente, se realizaron chequeos ecográficos cada 48 horas y, al momento de registrar el celo siguiente, una vez al día hasta detectar la próxima ovulación (Fig. 5).

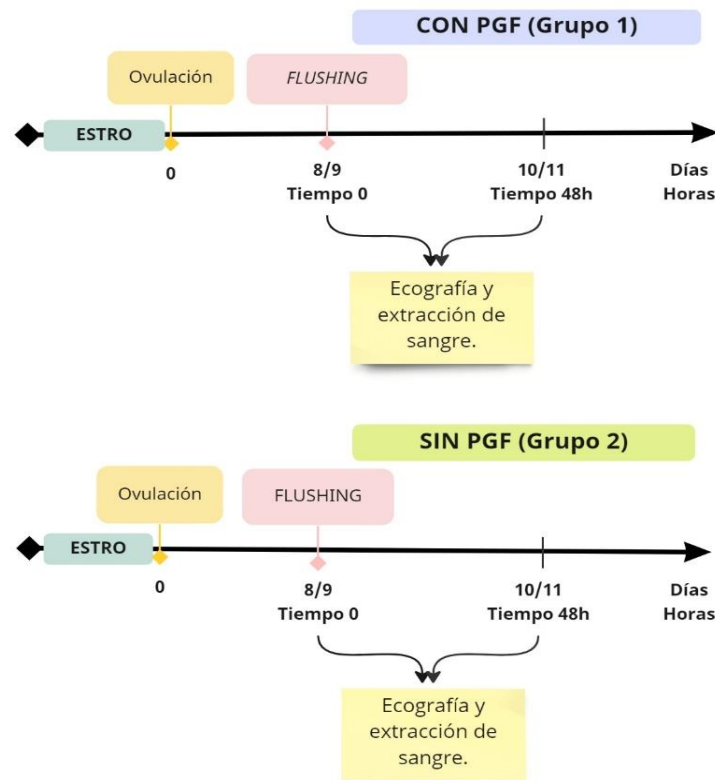


Figura 5. Diseño experimental.

4.4 Lavaje uterino para recuperación embrionaria

Para realizar este procedimiento, la cola de la yegua fue envuelta y asegurada hacia un lado. Se realizó un lavado minucioso del área perineal, vulva y vestíbulo con jabón líquido sin antisépticos, para evitar la contaminación de la sonda. El medio elegido para realizar los lavajes embrionarios fue solución de Ringer Lactato (RL), el cual fue previamente atemperada a 37°C. Las tubuladuras con forma de Y, el filtro y la sonda se llenó previamente

“Efectos del lavaje embrionario sobre valores séricos de progesterona en yeguas raza árabe donantes de embriones” MV. Rubio, M. Soledad.

con RL antes de comenzar el procedimiento para evitar que ingrese aire en el sistema. Para realizar el lavaje uterino se utilizó un catéter de silicona Foley 28 o 32 FR (Fig. 6) que se introdujo a través del cérvix. Una vez dentro del útero, el balón fue insuflado con 60 ml de aire, para prevenir la salida del catéter a través del cuello uterino (Fig. 7). Una vez corroborado que el catéter se encontraba en el útero, se infundió 1 litro de solución comercial RL. El ingreso de líquido al útero se controló por palpación rectal para asegurarse que ambos cuernos estuviesen llenos y se masajearon posteriormente. Luego de la infusión se procedió a recuperar el medio de lavado invirtiendo el flujo hacia un filtro tipo Em Con™. Se repitió el procedimiento 4 veces, llegando a un total de 4 litros totales por lavaje uterino.



Figura 6. Tipos de sondas Foley utilizadas para el lavaje embrionario, medidas CH 32 y CH 28.

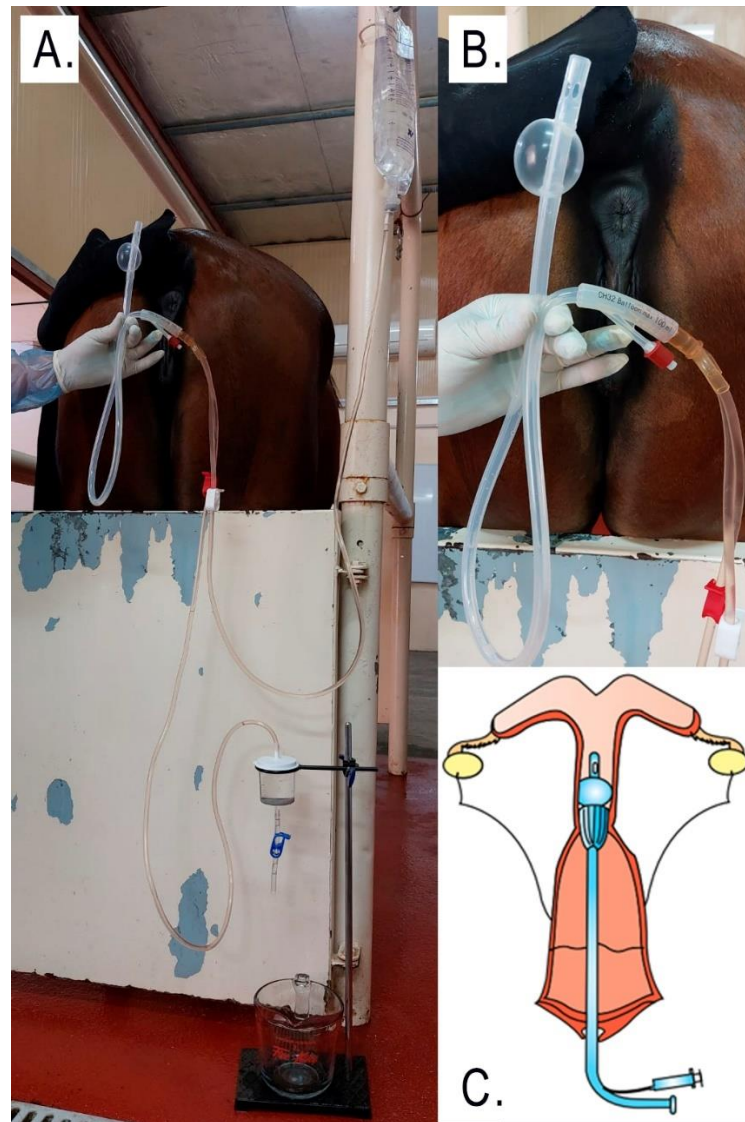


Figura 7. A. Equipo de lavaje uterino para recuperación embrionaria completo. B. Sonda Foley con balón completamente insuflado. C. Imagen representativa del balón insuflado ubicado en el cuerpo uterino. Imágenes A y B propias, C extraída del manual de Samper (2009).

4.5 Medición de niveles de progesterona

Previo al lavaje embrionario (tiempo 0), y 48 horas posteriores al mismo, tiempo suficiente para la instauración de la luteólisis (Ginther et al., 2011), se tomaron muestras de 3 ml de sangre de la vena yugular. Las muestras obtenidas se colocaron en tubos de 5 ml sin anticoagulante, luego se centrifugaron, se separó el suero y fue almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Para evaluar los niveles de progesterona sérica se utilizó un kit de ELISA (DRG Instruments, Marburg, Germany.). Este ensayo mostró un coeficiente de variación intra- e inter- ensayo de 6,4% y 6,6% respectivamente, y reactividades cruzadas de 0,35% para Pregnenolona, 0,3% para $17\alpha\text{-OH}$ progesterona, 1,1% para 11-desoxicorticosterona y 0,2% para corticosterona (Wilsher et al., 2021; Wilsher et al., 2022).

4.6 Tamaño del cuerpo lúteo

Previo al lavaje embrionario, y 48 horas posteriores al mismo, se identificó y diferenció ultrasonográficamente el CL del estroma ovárico. Se analizaron las imágenes donde se observó el mayor tamaño de la estructura en la sección transversal. Se tomaron 2 medidas transversales del diámetro máximo de cada CL y luego se realizó un promedio para determinar el tamaño (Fig. 8). La primera medida se extendió de la interfase entre el estroma y el tejido lúteo de un lado del CL al lado opuesto. La segunda determinación se realizó perpendicular a la primera. Ambas medidas se promediaron para obtener el diámetro total promedio de la sección transversal y determinar el tamaño del CL.



Figura 8. Imagen representativa de la metodología utilizada para la medición de CL, tomada con el ecógrafo MyLab™OneVET, Esaote.

4.7 Edema endometrial

Mediante el uso de la ecografía, se determinó la presencia o ausencia de edema endometrial. La presencia fue a su vez graduada en una escala de 0 a 3 (Mccue et al., 2011;Mateu-Sánchez et al., 2016). El valor mínimo de 0 fue compatible con una ecotextura de diestro, sin cambios ultrasonográficos en los pliegues endometriales uterinos. El valor de 3 fue el máximo edema observado en los pliegues endometriales (Fig. 9). La evaluación fue realizada siempre por el mismo operador.

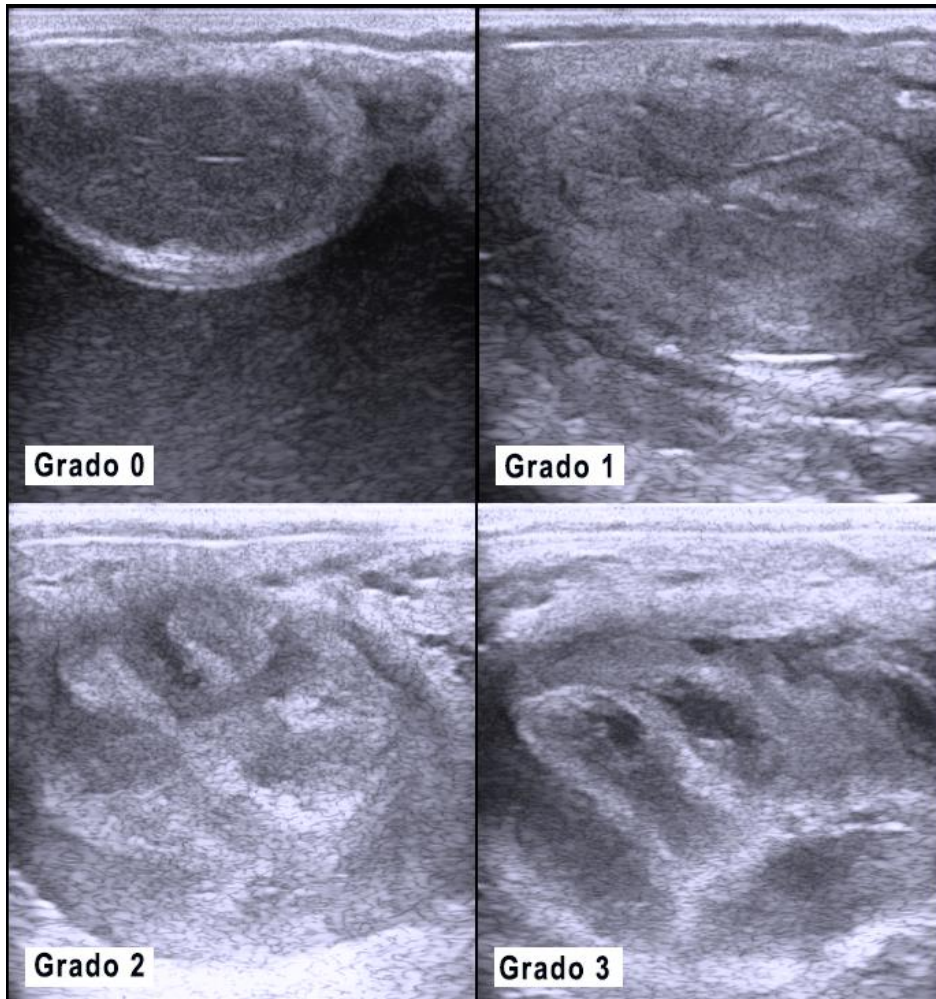


Figura 9. Imágenes representativas de la escala utilizada para clasificar el edema uterino.

4.8 Fluido intrauterino

Mediante ecografía, se evaluó la presencia o ausencia de fluido intrauterino y la graduación utilizada fue de 0 a 4 (tabla 1 y Fig. 10), según los criterios descritos por Brinsko et al.,2003.

Tabla 1. Graduación utilizada para clasificar la presencia o ausencia de fluido intrauterino.

GRADUACIÓN	CANTIDAD DE FLUIDO
0	Sin fluido
1	0 a 10 mm
2	10 a 20 mm
3	Entre 20 a 30 mm
4	>30 mm

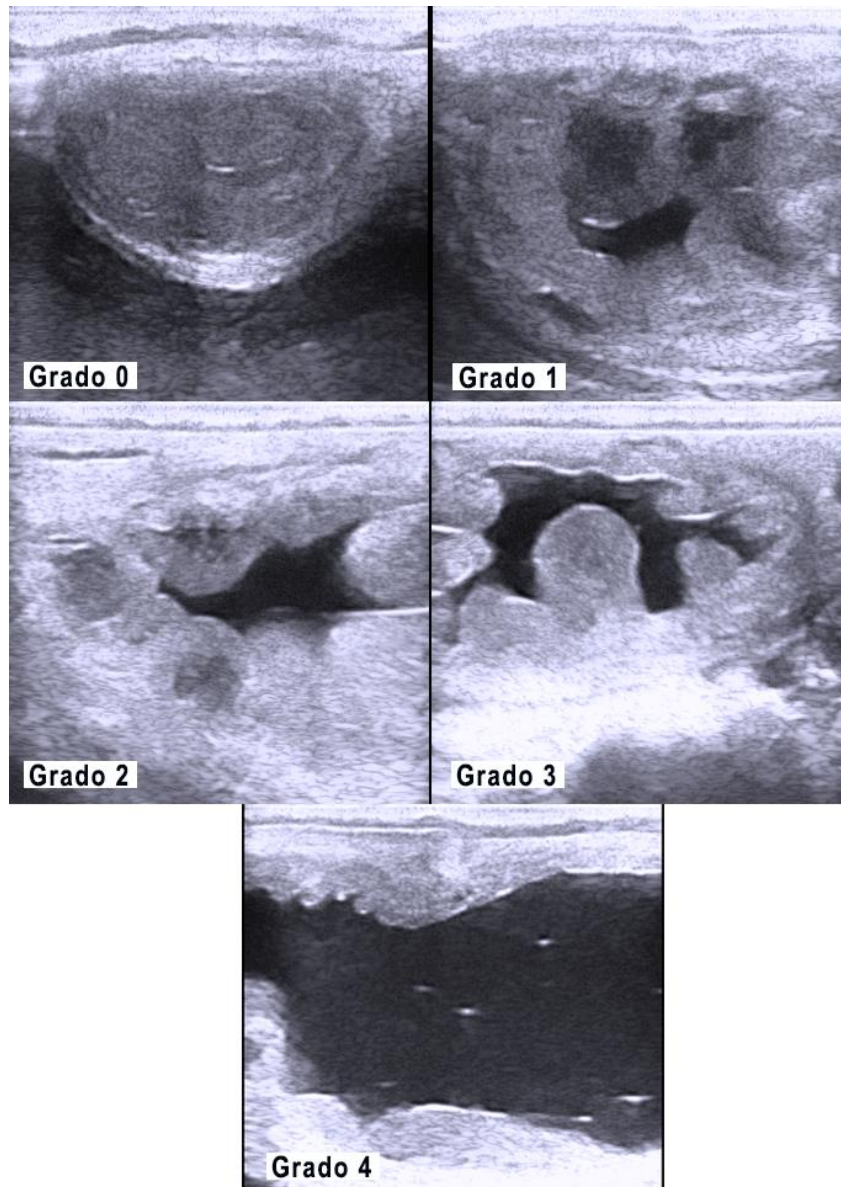


Figura 10. Imágenes representativas de la graduación de fluido intrauterino.

4.9 Intervalo tratamiento ovulación (ITO)

Si bien clásicamente, la definición de ITO establecida por Cuervo-Arango (2015) se basa en la aplicación de PGF, en el presente trabajo el ITO será definido por grupo según el tratamiento recibido en cada animal. Cabe aclarar que, en este caso, los tratamientos consistieron en 1) lavaje uterino + PGF y 2) lavaje uterino solamente SIN PGF, con el objetivo principal de poder realizar una comparación entre ambos grupos tratados.

Definición de ITO por grupo:

Grupo 1: tiempo desde el lavaje uterino + PGF hasta la ovulación, medido en días.

Grupo 2: tiempo transcurrido desde el lavaje uterino hasta la ovulación siguiente.

4.10 Intervalo Inter Ovulatorio (IIO)

Se lo consideró como el intervalo en días entre 2 ovulaciones consecutivas, para ambos Grupos.

4.11 Análisis estadístico

Los datos cuantitativos fueron sometidos a una prueba de normalidad Shapiro-Wilks. Cuando se verificó normalidad en la distribución de datos, se realizó un análisis paramétrico mediante T-Student. Los datos que no presentaron una distribución normal fueron analizados a través del test de Mann-Whitney. Para el análisis de la concentración de progesterona y el diámetro de CL se realizó un ANOVA de 2 vías, seguido por el *post hoc* de Tukey para comparar las diferencias entre las medias de los diferentes grupos. Se utilizó el programa Graph Pad Prism versión 8 (Graph Pad Software, California, EE. UU). En todos los casos, la diferencia entre medias fue considerada significativa con un $p < 0,05$.

Para evaluar los datos cualitativos correspondientes a la presencia o ausencia de edema y fluido uterino posterior a los tratamientos, se realizaron tablas de contingencia. Para comparar estadísticamente los resultados de edema a las 0 y 48h entre los grupos 1 y 2, se realizó una prueba para las diferencias de proporciones poblacionales, transformando a la variable como cualitativa nominal (sin edema vs con edema). La hipótesis nula utilizada para la prueba estadística fue que el porcentaje de yeguas con edema en ambos grupos es igual ($H_0: P_1 - P_2 = 0$). La hipótesis alternativa fue que el porcentaje de yeguas con edema en ambos grupos es diferente ($H_1: P_1 - P_2 \neq 0$).

Para esto se utilizó el programa RStudio 2022.07.1+554 "Spotted Wakerobin" Release (7872775ebddc40635780ca1ed238934c3345c5de, 2022-07-22) para Windows.

5 RESULTADOS

5.1 Medición de niveles de progesterona

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la concentración sérica de progesterona entre el Grupo 1 (lavaje uterino + PGF) y el Grupo 2 (lavaje uterino solo) a las 48 h pos lavaje uterino ($P < 0,0001$; Fig. 11). En las yeguas del Grupo 1 ($0,7 \pm 0,23$) disminuyó considerablemente con respecto al Grupo 2 ($10,89 \pm 3,57$). No se observó diferencia significativa en los valores de concentración de progesterona para ambos grupos en el tiempo 0 (Grupo 1: $12,08 \pm 3,91$; Grupo 2: $12,62 \pm 4,76$). Se consideró luteólisis cuando las concentraciones de progesterona fueron < 1 ng/ml (Castro et al., 2021).

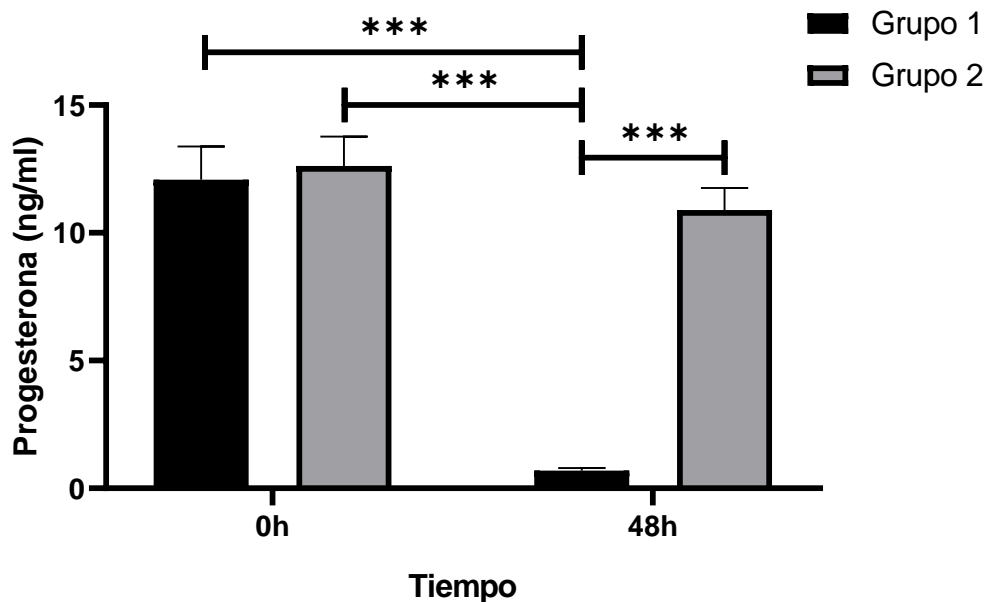


Figura 11. Dosaje de progesterona sérica a las 0h y 48h posteriores al lavaje embrionario para ambos grupos. Grupo 1: con administración de PGF, Grupo 2: sin administración de PGF. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. ANOVA II, post hoc Tukey (** $p < 0,0001$; Grupo 1 $n=9$, Grupo 2 $n=17$).

5.2 Tamaño del cuerpo lúteo

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de los CL ($P=0,6284$, Fig. 12) entre ambos grupos.

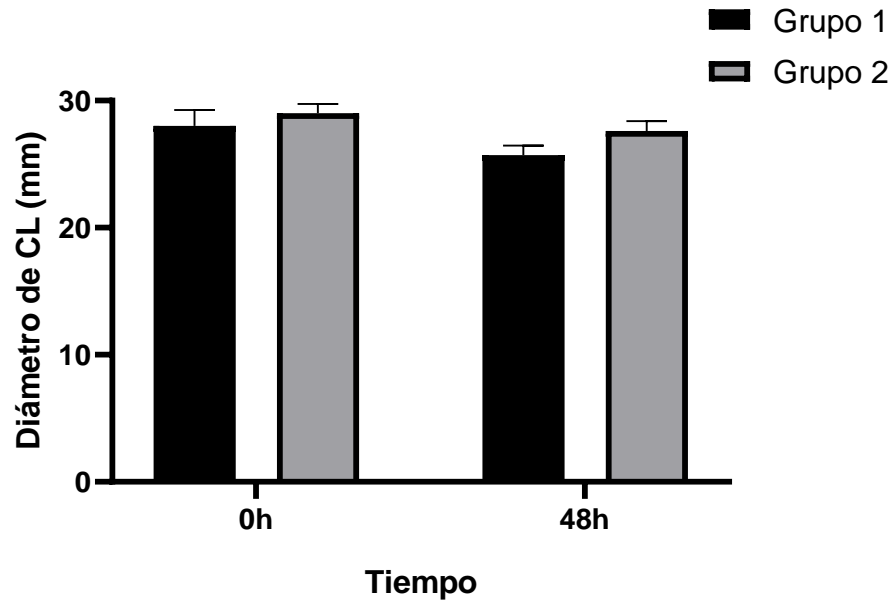


Figura 12. Tamaño de los CL a las 0h y 48h posteriores al lavaje embrionario para ambos grupos. Grupo 1: con administración de PGF, Grupo 2: sin administración de PGF. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. ANOVA II, post hoc Tukey (n=9 Grupo 1, n=17 Grupo 2).

5.3 Edema endometrial

No se registraron diferencias significativas entre los porcentajes de edema en yeguas de ambas poblaciones, a ninguno de los tiempos evaluados (Tiempo 0h $p=0,7661$ / Tiempo 48h $p=0,5139$). A las 48 h del lavaje uterino para recuperación embrionaria se observó la presencia de edema endometrial en el 44.44% (4/9) de los ciclos evaluados del Grupo 1 y en 23.53% (4/17) del Grupo 2. Una de las yeguas del Grupo 2 presentó edema endometrial antes y después del lavaje uterino.

5.4 Fluido intrauterino

En un solo ciclo analizado perteneciente al Grupo 1 (1/9) se registró la presencia de 0 a 10 mm de fluido uterino (Grado 1). Este hallazgo se corresponde con la presencia de edema uterino en el mismo ciclo y para el mismo animal. En ningún ciclo de los animales del Grupo 2 se observó la presencia de fluido uterino a las 48h (Grado 0).

5.5 Intervalo tratamiento Ovulación (ITO)

La duración del ITO fue menor en los ciclos del Grupo 1 ($P=0,0114$; Fig. 13), la ovulación se produjo en promedio 2.2 días antes comparado a los ciclos en los cuales solo se realizó el lavaje uterino para recuperación embrionaria. El diestro fue significativamente más corto en los ciclos en los que se aplicó PGF.

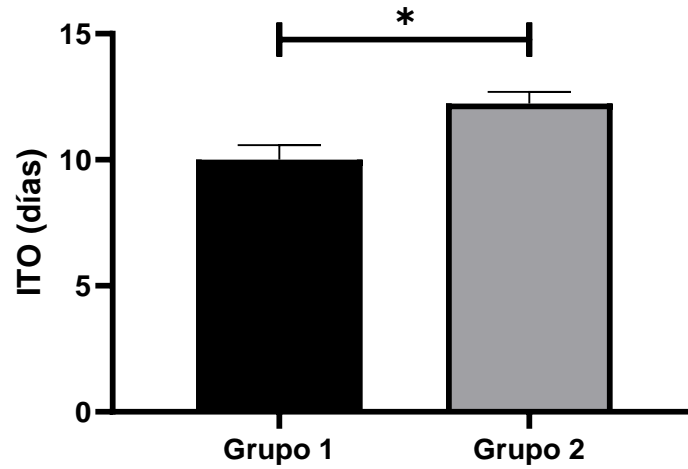


Figura 13. Duración del ITO en días para el grupo 1 y 2. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Se realizó la prueba de Mann-Whitney (* $p < 0,05$; $n = 9$ Grupo 1, $n = 17$ Grupo 2).

5.6 Intervalo Inter Ovulatorio (IIO)

Se encontraron diferencias significativas en la duración de los IIO entre los grupos ($P = 0,0057$). Las yeguas del Grupo 1 tuvieron un IIO más corto que las del Grupo 2 (Fig. 14).

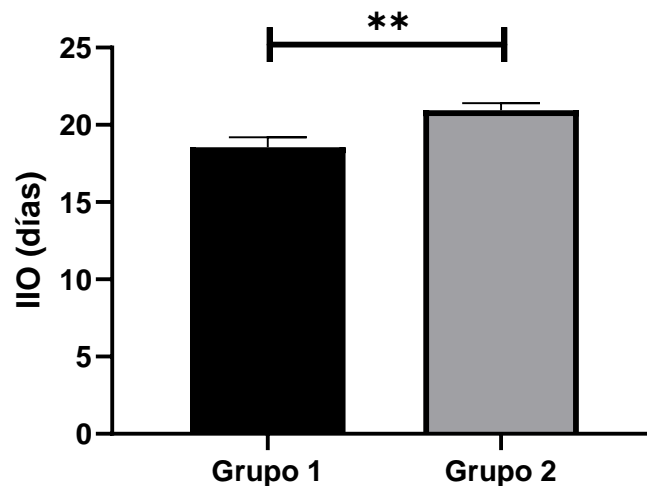


Figura 14. Duración del IIO en días para el grupo 1 y 2. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Se realizó la prueba de t de Student no pareada (** $p < 0,01$; $n = 9$ Grupo 1, $n = 17$ Grupo 2).

6 DISCUSIÓN

El concepto de que la manipulación cervical puede alterar la función lútea no es nuevo, y la literatura sobre este tema puede ser confusa y contradictoria. Se ha reportado la liberación de prostaglandinas y/o una reducción en las concentraciones de progesterona luego de procedimientos en los cuales se realizó manipulación cervical (Ginther & Meckley, 1972; Sirois et al., 1987; Kask et al., 1997; DeLuca et al., 2011) o luego de una dilatación cervical en yeguas en diestro. En el presente estudio, el lavaje uterino para recuperación embrionaria no indujo la luteólisis en ningún ciclo del Grupo 2, al contrario de lo que sucedió en los ciclos del Grupo 1, los cuales sufrieron luteólisis en su totalidad a las 48 horas posteriores. No se observó luteólisis en el Grupo 2 a pesar de los procedimientos realizados durante el lavaje uterino con la finalidad de recuperar embriones que incluyeron: manipulación cervical realizada por el paso del catéter o por el orificio del cérvix, o cuando el balón hizo tope con el mismo para evitar la salida del catéter y líquido hacia el exterior, ni al intentar recuperar el RL durante el lavaje uterino.

La manipulación uterina también ha sido postulada como una posible causante del inicio de la luteólisis (Neely et al., 1974; Hurtgen & Ganjam, 1979; Koblischke et al., 2008b; DeLuca et al., 2011). Sin embargo, esto no se observó en el presente trabajo; donde el útero fue masajeado por vía transrectal en toda su longitud durante la infusión y la recuperación del RL para asegurar que el líquido llenara cada cuerno uterino y generara turbulencia, ayudando a la recuperación del embrión. Este proceso se repitió 4 veces, en ambos grupos, sin causar lisis del CL. Esto coincide con lo reportado por Bowen., et al (1985), y otros (Wilde et al., 1989; Handler et al., 2003) quienes reportaron que la manipulación cervical no tuvo un efecto en la duración de diestro ni en los valores de progesterona como respuesta a la manipulación, pero sí cuando se produjo dilatación cervical (Handler et al., 2003). DeLuca et al. (2011) concluyó que el procedimiento de transferencia embrionaria transcervical podría estar asociado con luteólisis en un bajo porcentaje de yeguas, presumiblemente como consecuencia de la liberación de prostaglandinas después de la manipulación cervical y/o uterina. Los materiales utilizados cuando se realizaron y publicaron muchos de los estudios que proponen la liberación de $PGF2\alpha$ al realizar lavajes uterinos son muy diferentes en cuanto a calidad y ductilidad en comparación con los utilizados actualmente en reproducción equina. Anteriormente, los lavajes uterinos eran realizados con catéter de metal y el reflujó era evitado mediante sujeción digital directa sobre el cérvix durante un período de 2 minutos (Arthur, 1975), a diferencia de los catéteres de silicona utilizados en la actualidad, los cuales

poseen un balón, que al insuflarse en útero, evita la salida del mismo a través del cérvix, y por ende requieren una menor manipulación cervical.

En la mayoría de los trabajos citados previamente pertenecientes a la década del 70' y 80', en los que se reportó luteólisis por manipulación cervical y/o uterina, el seguimiento de las yeguas y la evaluación de la respuesta al tratamiento se llevó a cabo a través de palpación rectal y retajeo con padrillo. Estos métodos, que eran empleados regularmente para determinar el desarrollo folicular, el momento de la ovulación y la respuesta de celo frente a un semental, debido a que o no existía la ultrasonografía en equinos o todavía no se utilizaba de forma rutinaria eran muy poco precisos. Al utilizar estos métodos no siempre es posible determinar el momento exacto de la ovulación por palpación rectal, incluso con chequeos diarios y algunas yeguas no presentan síntomas de receptividad hacia el padrillo aun estando en estro, debido a que es una respuesta que tiene un factor animal dependiente (receptividad al padrillo puede prolongarse aun ocurriendo la ovulación). Además, las yeguas pueden estar en la fase estral, tener desarrollo folicular y ovular sin mostrar conducta de celo como en el caso de yeguas que nunca han parido (primíparas), con cría al pie, o yeguas subordinadas que pueden ser inhibidas en presencia de una yegua dominante (Crowell-Davis, 2007). Las yeguas también muestran preferencias individuales por sementales particulares y, por el contrario, no tienen preferencia o evitan a otros sementales (Pickerel et al., 1993). Las yeguas con "celo silencioso" pueden tener concentraciones más bajas de 17β estradiol que las yeguas que expresan celo normal (Nelson et al., 1985). En la actualidad se cuentan con mejores métodos para la determinación de estos parámetros, y es por esto que los resultados encontrados podrían diferir de los trabajos previos.

La ecografía inicialmente utilizada para examinar el tracto reproductivo de las yeguas, fue introducida en 1980 (Chevalier & Palmer, 1982). A partir del año 1983 la ultrasonografía se transformó en una importante herramienta de investigación en yeguas (Ginther & Pierson, 1983). En 1984 publicaron un estudio sobre el estado folicular y luteal en yeguas, y caracterizaron ultrasonográficamente los ovarios equinos. En este trabajo analizaron la coincidencia de la ubicación del CL (ovario izquierdo o derecho) y su correspondiente determinación por ultrasonografía. En el 88% hubo coincidencia en ambas técnicas, en el 12 % restante el registro fue incierto (Ginther & Pierson, 1984b) . Lo que posiblemente podría conducir a estimar de manera errónea por ejemplo la edad del CL, y realizar un tratamiento luteolítico cuando el CL no es maduro para responder al mismo. Un factor importante para considerar es que cuando el ecógrafo no era utilizado se utilizaba la

palpación rectal, este segundo método de detección también podía trasladarse a diagnosticar de manera incorrecta la edad de un CL. Posiblemente algunas yeguas tenían un CL de 4 días en lugar de 5 días, día en el cual el CL es completamente sensible a PGF (Coffman & Pinto, 2016). Por lo que los resultados en muchos de los trabajos deberían cuestionarse ya que los tratamientos pudieron ser realizados cuando el CL no era sensible a PGF o en los casos de administraciones posteriores a los 14 días, cuando la liberación endógena de PGF2 α ya comenzó. La persistencia del cuerpo lúteo primario era considerada una entidad clínica con una prevalencia elevada en yeguas, pero gracias a la ecografía se pudo identificar que esos valores de progesterona sostenidos en el tiempo se debían en su gran mayoría a ovulaciones diestrales (Ginther & Pierson, 1989).

Diferentes grupos informaron que la infusión intrauterina de solución salina inducía el celo en yeguas en diestro. En la revisión bibliográfica los trabajos que reportaron luteólisis como consecuencia del lavado uterino eran realizados con solución salina cuyo pH no fue informado (Ginther & Meckley, 1972; Neely et al., 1974; Arthur, 1975; Neely et al. 1979). Pascoe et al. (1989), investigaron el efecto de la infusión intrauterina de solución salina *bufferada* (tamponada) con fosfato y observaron que no fue alterada la duración de la fase lútea, en comparación con el grupo de control. Sin embargo, al utilizar solución salina acidificada, con un pH = 3 provocó liberaciones significativas de PGF2 α dentro de la primera hora después de la infusión, y la fase lútea se acortó. Los resultados de este estudio mostraron que el pH fue el factor principal para provocar la liberación de PGF2 α mediante la infusión intrauterina de solución salina, mientras que el aumento de la temperatura (45°C) y la osmolaridad no tuvieron ningún efecto sobre la liberación de PGF α .

En las yeguas, durante el estro, los valores de pH del lumen uterino son mayores (pH 6.9 \pm 0.4) que durante el diestro (pH 6.4 \pm 0.4) (Thompson et al., 2018). La solución salina comercial es al 0.9% donde el pH suele tener un valor promedio de 5 comparado con el valor RL, el cual posee un valor pH en promedio 6,5. La solución salina tiene un pH más ácido comparado con el RL. En este estudio se utilizó RL para los lavajes uterinos, que posee un valor de pH similar al fisiológico, y no desencadenó un efecto luteolítico.

Previo al uso de las prostaglandinas y el advenimiento de la ecografía, la inducción de la luteólisis se limitaba a infundir grandes cantidades de solución salina intrauterina. En algunos casos los resultados eran exitosos, lo que podría deberse a la utilización de solución salina no *bufferada* que irritaba el endometrio (Pascoe et al., 1989) y/o a que algunas de esas

yeguas se infectaban durante este tratamiento y en ambos casos se producía liberación aguda de PGF2 α (Allen & Wilsher, 2018).

En el presente estudio no se encontró una disminución significativa del diámetro del CL a las 48 h pos tratamiento, aunque sí se observó una disminución de los niveles séricos de progesterona en el Grupo 1. Esto concuerda con lo descrito previamente donde la regresión funcional ocurre antes que la morfológica (Ginther et al., 2005; Ginther, Gastal, et al., 2007; Aurich, 2011). En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede determinar que el diámetro del CL no es una referencia fidedigna para la estimación de la concentración de P4 en yeguas donantes de embriones raza árabe.

Algunos de los signos clínicos de endometritis pueden incluir fluido intrauterino, un patrón inusual o excesivo edema endometrial y ciclos estrales de duración anormal (Diel de Amorim et al., 2016). Identificar y valorar los patrones de edema y/o fluido uterinos, sirven para diagnosticar eventos fisiológicos o patológicos de inflamación y/o infección uterina (Ginther & Pierson, 1984a). En este trabajo no se encontraron diferencias significativas entre Grupo 1 y 2 para la variable edema y solo una yegua en el Grupo 1 presentó fluido grado 1 y edema grado 1 en el mismo ciclo. Carnevale et al., (2005), evaluó los cambios uterinos asociados a repetidas inseminaciones y colecciones de embriones, donde registró un aumento de la inflamación crónica del endometrio como consecuencia de efectos aditivos de insultos uterinos reiterados. La contaminación uterina de la yegua donante de embriones es una causa de edema y colecta uterina de fluido, y puede deberse a diversos factores. Entre ellos se encuentran el semen contaminado y, con mayor frecuencia, la infección residual y la endometritis de procedimientos reproductivos previos, como por ejemplo, a consecuencia de múltiples lavajes de embriones en la misma yegua durante una temporada reproductiva (Hartman, 2011). Tanto el edema y fluido son indicadores de salud uterina y su presencia o ausencia representan parámetros clínicos relevantes a la hora de tomar decisiones en cada ciclo reproductivo. En este trabajo no encontramos diferencias entre los grupos por lo que podríamos inferir que la no administración de PGF luego del lavaje uterino no predispone a factores que afecten la salud uterina.

Para reducir el IIO se ha recurrido a estrategias tales como administrar PGF 2 días antes del lavaje uterino para recuperación embrionaria (Goretti et al., 2011) aumentando así las oportunidades de obtener embriones a lo largo de la temporada reproductiva. Se ha encontrado una asociación entre la duración de la fase folicular con ecotextura tipo estro y

la subsiguiente probabilidad de preñez. El porcentaje de preñez se ha reducido significativamente en yeguas donde el edema endometrial ha tenido una duración menor a 4 días en su fase folicular del ciclo estral (Mateu-Sánchez et al., 2016). En el presente estudio tanto IIO como el ITO tuvieron una duración menor en el Grupo 1 y la ovulación se produjo en promedio 2.2 días antes, comparado al Grupo 2. El ITO tuvo una duración en promedio de 10 días para el Grupo 1 y de 12, 2 días para el Grupo 2.

Una menor tasa de recuperación de embriones en yeguas donantes con un ITO menor a 6 días en comparación con las yeguas con un ITO más largo ha sido observada por Pietrani et al. (2019). En ningún Grupo estudiado el ITO fue menor a 6 días, lo que puede explicarse debido a que solo 2 yeguas pertenecientes al Grupo 2 presentaron un folículo ≥ 28 mm al momento del lavaje embrionario. Las yeguas que poseen un folículo ≥ 28 mm al momento del lavaje embrionario y son tratadas con PGF tendrán un ITO y un IIO de menor duración, obteniendo así un mayor número de ciclos por temporada para lograr los objetivos planteados. Sabiendo que la fertilidad en las yeguas que ovulan poco tiempo después del tratamiento con PGF se reduce, probablemente obtendríamos el mismo número de embriones por temporada si no administráramos PGF en esos casos, ahorrando trabajo veterinario, materiales y el costo del semen (Pietrani et al., 2019). El conocimiento de las diversas respuestas de las yeguas a la administración de PGF puede ayudar a mejorar la eficiencia reproductiva en los sistemas de producción intensiva a la hora de decidir su aplicación o no.

7 CONCLUSIONES

A nuestro conocimiento, este es el primer estudio que evalúa el efecto del lavaje embrionario sobre los valores séricos de progesterona. En base a los resultados obtenidos, se concluye que el lavaje uterino para recuperación embrionaria con RL, con la consecuente manipulación cervical y uterina, por sí mismo, no inducen la luteólisis en las yeguas donantes. La finalidad de este estudio fue estimar de forma indirecta si hubo liberación de PGF2 α evaluando presencia o ausencia de luteólisis a través de la medición de los niveles séricos de progesterona y del IIO. Al no medir en este trabajo PGFM, podemos inferir que el procedimiento de lavaje uterino pudo inducir la liberación de PGF2 α , pero que, en tal caso, esta no fue suficiente para inducir luteólisis en nuestro grupo experimental.

8 REFERENCIAS

- Adams, G. P., Kastelic, J. P., Bergfelt, D. R., & Ginther, O. J. (1987). Effect of uterine inflammation and ultrasonically-detected uterine pathology on fertility in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 35, 445–454.
- Allen, W. R., & Rossdale, P. D. (1973). A Preliminary Study Upon the Use of Prostaglandins for Inducing Oestrus in Non-cycling Thoroughbred Mares. *Equine Veterinary Journal*, 5(4), 137–140. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1973.tb03213.x>
- Allen, W. R., & Rowson, L. E. (1975). Surgical and non-surgical egg transfer in horses. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 23, 525–530.
- Allen, W. R., & Rowson, L. E. . (1972). Transfer of ova between horses and donkeys. *Proceedings of the 7th International Congress on Animal Reproduction and AI, Munich.*, 484–487.
- Allen, W. R., STEWART, F., COOPER, M. J., CROWHURST, R. C., SIMPSON, D. J., McENERY, R. J., GREENWOOD, R. E. S., ROSSDALE, P. D., & RICKETTS, S. W. (1974). Further Studies on the Use of Synthetic Prostaglandin Analogues for Inducing Luteolysis in Mares. *Pest Articles and News Summaries, Section C: Weed Control*, 8(4), 315–318. <https://doi.org/10.1080/05331856209432714>
- Allen, W. R., & Wilsher, S. (2018). Half a century of equine reproduction research and application: A veterinary tour de force. In *Equine Veterinary Journal* (Vol. 50, Issue 1, pp. 10–21). Equine Veterinary Journal Ltd. <https://doi.org/10.1111/evj.12762>
- Arthur, G. H. (1975). Influence of intrauterine saline infusion upon the oestrous cycle of the mare. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 23, 231–234.
- Aurich, C. (2011). Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science*, 124(3–4), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.005>
- Barker, K. J., Sanchez, S. M., Serrano, Y. R., Lacey, F. M., & Crabtree., J. R. (2019). *Prostaglandin F2 Alpha-Induced Maternal Behaviour for Fostering Orphan Foals and Mares*. 53, 2019.
- Bergfelt, D. R., & Adams, G. P. (2011). Luteal development. *Equine Reproduction, Volume 2, Ed.2*, 2011. <https://ezproxy2.library.colostate.edu/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=cookie,ip,url,cpid&custid=s4640792&db=lah&AN=20113059265&site=ehost-live>
- Bergfelt, D. R., Pierson, R. A., & Ginther, O. J. (2006). Regression and resurgence of the CL following PGF2 α treatment 3 days after ovulation in mares. *Theriogenology*, 65(8), 1605–1619. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.024>
- Bowen, M. J., Salsbury, J. M., Bowen, J. M., & Kraemer, D. C. (1985). *Non-surgical embryo auto-transfer in the mare*. 3–5. <https://doi.org/doi.org/10.1111/j.2042-3306.1985.tb04607.x>
- Brinsko, S. P., Rigby, S. ., Varner, D. D., & Blanchard, T. L. (2003). A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis. *Proceeding of the 49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*,

January, 363–365. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20053193206>

- Broadley, C., Watson, E. D., Menzies, G. S., & Bramley, T. A. (1994). Isolation of cell populations from the mare corpus luteum: comparison of mechanical and collagenase dissociation. *J Reprod Fertil.*, 7–15. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1020007>
- Burden, C. A., McCue, P. M., & Ferris, R. A. (2015). Effect of Cloprostenol Administration on Interval to Subsequent Ovulation and Anovulatory Follicle Formation in Quarter Horse Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(6), 531–535. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.02.011>
- Canisso, I. F., Segabinazzi, L. G. T. M., & Fedorka, C. E. (2020). Persistent breeding-induced endometritis in mares - a multifaceted challenge: From clinical aspects to immunopathogenesis and pathobiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4). <https://doi.org/10.3390/ijms21041432>
- Carnevale, E. M., Beisner, A. E., Mccue, P. M., Bass, L. D., & Squires, E. L. (2005). Uterine Changes Associated With Repeated Inseminations and Embryo Collections in Mares. *Reproduction*, 51, 202–203.
- Castro, T., Jacob, J. C., Stefani, G., Domingues, R. R., & Ginther, O. J. (2021). Concentrations of progesterone and a PGF2 α metabolite during the interovulatory interval compared to the corresponding days of pregnancy in mares. *Theriogenology*, 165, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.02.004>
- Chevalier, F., & Palmer, E. (1982). Ultrasonic echography in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 32, 423–430.
- Coffman, E. A., & Pinto, C. R. (2016). A Review on the Use of Prostaglandin F2 α for Controlling the Estrous Cycle in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 40, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.01.008>
- Cracken, J. A. M. C., Custer, E. E., & Lamsa, J. C. (1999). *Luteolysis : A Neuroendocrine-Mediated Event*. 79(2), 263–324.
- Crowell-Davis, S. L. (2007). Sexual behavior of mares. *Hormones and Behavior*, 52(1), 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.03.020>
- Cuervo-Arango, J., Claes, A. N., & Stout, T. A. (2018). Effect of embryo transfer technique on the likelihood of pregnancy in the mare: A comparison of conventional and Wilsher’s forceps-assisted transfer. *Veterinary Record*, 183(10), 323. <https://doi.org/10.1136/vr.104808>
- Cuervo-Arango, J., Mateu-Sánchez, S., Aguilar, J. J., Nielsen, J. M., Etcharren, V., Vettorazzi, M. L., & Newcombe, J. R. (2015). The effect of the interval from PGF treatment to ovulation on embryo recovery and pregnancy rate in the mare. *Theriogenology*, 83(8), 1272–1278. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.01.010>
- da Costa, R. P. R., Branco, V., Pessa, P., Silva, J. R., & Ferreira-Dias, G. (2005). Progesterone receptors and proliferating cell nuclear antigen expression in equine luteal tissue. *Reproduction, Fertility and Development*, 17(6), 659–666. <https://doi.org/10.1071/RD05024>
- DeLuca, C. A., McCue, P. M., Patten, M. L., & Squires, E. L. (2011). Effect of a Nonsurgical Embryo Transfer Procedure and/or Altrenogest Therapy on Endogenous

- Progesterone Concentration in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31(2), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2010.12.002>
- Diel de Amorim, M., Gartley, C. J., Hill, A., Scholtz, E. L., Chenier, T. S., Foster, R. A., Hayes, A., & Diel de Amorim, M. (2016). Comparison of Clinical Signs, Endometrial Culture, Endometrial Cytology, Uterine Low-Volume Lavage, and Uterine Biopsy and Combinations in the Diagnosis of Equine Endometritis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 44, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.10.012>
- Douglas, R. H., & Ginther, O. J. (1972). *EFFECT OF PROSTAGLANDIN F2a ON LENGTH OF DIESTRUS IN MARES*.
- DRG Instruments, G., Frauenbergstra, G., International, D. R. G., & Ave, M. (n.d.). *Instructions for Use Progesterone ELISA*. 973.
- Estrous Cycle in the Mare • Equine-Reproduction.com, LLC*. (n.d.). Retrieved February 16, 2023, from <https://equine-reproduction.com/articles/mares/estrous-cycle>
- Ginther, O. J. (1974). *INTERNAL REGULATION OF PHYSIOLOGICAL PROCESSES THROUGH LOCAL VENOARTERIAL PATHWAYS*. 39(3), 550–564.
- Ginther, O. J. (2009). A 40-year odyssey into the mysteries of equine luteolysis. *Theriogenology*, 72(5), 591–598. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.05.016>
- Ginther, O. J. (2012). The end of the tour de force of the corpus luteum in mares. *Theriogenology*, 77(6), 1042–1049. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.026>
- Ginther, O. J., & Beg, M. A. (2012). The hour of transition into luteolysis in horses and cattle: A species comparison. *Theriogenology*, 77(9), 1731–1740. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.01.001>
- Ginther, O. J., Gastal, E. L., Gastal, M. O., & Beg, M. A. (2005). Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. *Biology of Reproduction*, 73(2), 315–323. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.040253>
- Ginther, O. J., Gastal, E. L., Gastal, M. O., Utt, M. D., & Beg, M. A. (2007). Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Animal Reproduction Science*, 99(1–2), 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.05.018>
- Ginther, O. J., Hannan, M. A., & Beg, M. A. (2011). Luteolysis and associated interrelationships among circulating PGF2 α , progesterone, LH, and estradiol in mares. *Domestic Animal Endocrinology*, 41(4), 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2011.06.003>
- Ginther, O. J., & Meckley, P. E. (1972). Effect of intrauterine infusion on length of diestrus in cows & mares. *Veterinary Medicine, Small Animal Clinician : VM, SAC*, 67(7), 751–754.
- Ginther, O. J., & Pierson, R. A. (1983). Ultrasonic evaluation of the reproductive tract of the mare; principles, equipment, and techniques. *Journal of Equine Veterinary Science*, 3(6), 195–201. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(83\)80014-8](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(83)80014-8)
- Ginther, O. J., & Pierson, R. A. (1984a). Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. *Theriogenology*, 21(3), 505–516. <https://doi.org/10.1016/0093->

691X(84)90412-6

- Ginther, O. J., & Pierson, R. A. (1984b). Ultrasonic anatomy of equine ovaries. *Theriogenology*, 21(3), 471–483. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(84\)90409-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90409-6)
- Ginther, O. J., & Pierson, R. A. (1989). Regular and irregular characteristics of ovulation and the interovulatory interval in mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 9(1), 4–12. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(89\)80110-8](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(89)80110-8)
- Ginther, O. J., Rodrigues, B. L., Ferreira, J. C., Araujo, R. R., & Beg, M. A. (2008). Characterisation of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂α (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(6), 684–693. <https://doi.org/10.1071/RD08077>
- Ginther, O. J., Rodriguez, M. B., & Beg, M. A. (2011). Concentrations of circulating hormones during the interval between pulses of a PGF₂α metabolite in mares and heifers. *Animal Reproduction Science*, 128(1–4), 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.08.009>
- Ginther, O. J., Siddiqui, M. A. R., & Beg, M. A. (2009a). Progesterone responses to intravenous and intrauterine infusions of prostaglandin F₂α in mares. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(5), 688–695. <https://doi.org/10.1071/RD09019>
- Ginther, O. J., Siddiqui, M. A. R., & Beg, M. A. (2009b). Physiologic and nonphysiologic effects of exogenous prostaglandin F₂α on reproductive hormones in mares. *Theriogenology*, 72(3), 417–424. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.03.014>
- Ginther, O. J., Utt, M. D., & Beg, M. A. (2007). Follicle deviation and diurnal variation in circulating hormone concentrations in mares. *Animal Reproduction Science*, 100(1–2), 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.08.025>
- Ginther, O. J., Utt, M. D., Bergfelt, D. R., & Beg, M. A. (2006). Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. *Animal Reproduction Science*, 95(1–2), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.10.008>
- Goff, A. K., Basu, S., & Kindahl, H. (1984). Measurement of 11-ketotetranor PGF metabolites: An approach for monitoring prostaglandin F₂α release in the mare. *Theriogenology*, 21(6), 887–896. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(84\)90382-0](https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90382-0)
- Goretti, R. G., Araújo, R. R., Filho, A. N. R., Araújo, G. H. M., Lopes, E. P., & Guimarães, J. D. (2011). Effects of timing of induced luteolysis in embryo donor mares on reproductive performance and pregnancy rate in recipient mares. *Theriogenology*, 75(6), 1170–1174. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.008>
- Handler, J., Königshofer, M., Kindahl, H., Schams, D., & Aurich, C. (2003). Secretion patterns of oxytocin and PGF₂α-metabolite in response to cervical dilatation in cyclic mares. *Theriogenology*, 59(5–6), 1381–1391. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01189-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01189-5)
- Hartman, D. L. (2011). Embryo transfer. *Equine Reproduction, Second Edition*, 129(22), 495. <https://doi.org/10.1136/vr.129.22.495-a>

- Hurtgen, J. P., & Ganjam, V. K. (1979). The effect of intrauterine and cervical manipulation on the equine oestrous cycle and hormone profiles. *Journal of Reproduction and Fertility, Suppl.* 27(27), 191–197.
- Hurtgen, J. P., & Whitmore, H. L. (1978). Effects of endometrial biopsy, uterine culture, and cervical dilatation on the equine estrous cycle. *Journal of the American Veterinary Medical Association, 173*(1), 97–100.
- Irvine, C. H. G., McKeough, V. L., Turner, J. E., Alexander, S. L., & Taylor, T. B. (2002). Effectiveness of a two-dose regimen of prostaglandin administration in inducing luteolysis without adverse side effects in mares. *Equine Veterinary Journal, 34*(2), 191–194. <https://doi.org/10.2746/042516402776767240>
- Kask, K., Odensvik, K., & Kindahl, H. (1997). Prostaglandin F2 α release associated with an embryo transfer procedure in the mare. *Equine Vet J.* <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1997.tb03125.x>
- Kimura, J., Hirano, Y., Takemoto, S., Nambo, Y., Ishinazaka, T., Himeno, R., Mishima, T., Tsumagari, S., & Yokota, H. (2005). Three-dimensional reconstruction of the equine ovary. *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia, 34*(1), 48–51. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2004.00567.x>
- Koblischke, P., Kindahl, H., Budik, S., Aurich, J., Palm, F., Walter, I., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Hoppen, H. O., & Aurich, C. (2008a). Embryo transfer induces a subclinical endometritis in recipient mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. *Theriogenology, 70*(7), 1147–1158. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.037>
- Koblischke, P., Kindahl, H., Budik, S., Aurich, J., Palm, F., Walter, I., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Hoppen, H. O., & Aurich, C. (2008b). Embryo transfer induces a subclinical endometritis in recipient mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. *Theriogenology, 70*(7), 1147–1158. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.037>
- Kuzrock, R., & Lieb, C. (1930). Biochemical studies of human semen II. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(32\)91023-0](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(32)91023-0)
- LeBlanc, M. M. (2010). Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. *Reproduction in Domestic Animals, 45*(SUPPL. 2), 21–27. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01634.x>
- Lofstedt, R. M. (1988). Control of the estrous cycle in the mare. *Veterinary Clinics of North America. Equine Practice, 4*(2), 177–196. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30635-1](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30635-1)
- Loy, R. G., Buell, J. R., Stevenson, W., & Hamm, D. (1979). *Sources of variation in response intervals after prostaglandin treatment in mares with functional corpora lutea.*
- Mateu-Sánchez, S., Newcombe, J. R., Garcés-Narro, C., & Cuervo-Arango, J. (2016). The period of the follicular phase during which the uterus of mares shows estrus-like echotexture influences the subsequent pregnancy rate. *Theriogenology, 86*(6), 1506–1515. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.009>
- Mccue, P. M., Scoggin, C. F., & Lindholm, A. R. G. (2011). *Estrus* (Angus O. McKinnon,

E. L. Squires, W. E. Vaala, & D. D. Varner (Eds.); 2nd Editio).

- Miller, P. A., Lauderdale, J. W., & Geng, S. (1976). Effects of various doses of Prostin F2 alpha on estrous cycles, rectal temperature, sweating, heart rate and respiration rate in mares. *Journal of Animal Science*, 42(4), 901–911.
<https://doi.org/10.2527/JAS1976.424901X>
- Nagel, C., & Aurich, C. (2022). Induction of parturition in horses – from physiological pathways to clinical applications. *Domestic Animal Endocrinology*, 78, 106670.
<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2021.106670>
- Neely, D. P., Hughes, J. P., Stabenfeldt, G. H., & Evans, J. W. (1974). The influence of intrauterine saline infusion on luteal function and cyclical activity in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 6(23), 235–239.
- Neely, D. P., Stabenfeldt, G. H., Kindahl, H., Hughes, J. P., & Kendrick, J. W. (1979). Effect of intrauterine saline infusion during the late luteal phase on the estrous cycle and luteal function of the mare. *American Journal of Veterinary Research*, 40(5), 665–668.
- Nelson, E. M., Kiefer, B. L., Roser, J. F., & Evans, J. W. (1985). Serum estradiol-17 β concentrations during spontaneous silent estrus and after prostaglandin treatment in the mare. *Theriogenology*, 23(2), 241–262. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(85\)90028-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(85)90028-7)
- Newcombe, J. R., Jöchle, W., & Cuervo-Arango, J. (2008). Effect of Dose of Cloprostenol on the Interval to Ovulation in the Diestrous Mare: A Retrospective Study. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28(9), 532–539.
<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2008.07.017>
- Niswender, G., Juengel, J. L., Silva, P. J., Rollyson, M. K., & McIntush, E. W. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, 80(1), 1–29. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.1>
- Oguri, N., & Tsutsumi, Y. (1974). NON-SURGICAL EGG TRANSFER IN MARES. *J Reprod Fertil.*, 313–320. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0410313>
- Pascoe, D. R., Stabenfeldt, G. H., Hughes, J. P., & Kindahl, H. (1989). Endogenous prostaglandin F2 alpha release induced by physiologic saline solution infusion in utero in the mare: effect of temperature, osmolarity, and pH. *American Journal of Veterinary Research*, 50(7), 1080–1083.
- Pashen, R. L., Lascombes, F. A., & Darrow, M. D. (1993). The application of embryo transfer to polo ponies in Argentina. *Equine Veterinary Journal*, 25(S15), 119–121.
<https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1993.tb04844.x>
- Pate, J. L. (2018). Luteolysis. In *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 106–113). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64397-0>
- Pickerel, T. M., Crowell-Davis, S. L., Caudle, A. B., & Estep, D. Q. (1993). Sexual preference of mares (*Equus caballus*) for individual stallions. *Applied Animal Behaviour Science*, 38(1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(93\)90037-P](https://doi.org/10.1016/0168-1591(93)90037-P)
- Pietrani, M., Losinno, L., & Cuervo Arango, J. (2019). Effect of the Interval From Prostaglandin F2alpha Treatment to Ovulation on Reproductive Efficiency Rates in a Commercial Equine Embryo Transfer Program. *Journal of Equine Veterinary*

“Efectos del lavaje embrionario sobre valores séricos de progesterona en yeguas raza árabe donantes de embriones” MV. Rubio, M. Soledad.

Science, 78, 123–126. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.04.006>

PIPER, P. J., VANE, J. R., & WYLLIE, J. H. (1970). Inactivation of Prostaglandins by the Lungs. *Nature*, 225(5233), 600–604. <https://doi.org/10.1038/225600a0>

Riera, F. L., & McDonough, J. (1993). Commercial embryo transfer in polo ponies in Argentina. *Equine Veterinary Journal*, 25(S15), 116–118. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1993.tb04843.x>

Samper, J. C. (1997). Ultrasonographic Appearance and the Pattern of Uterine Edema to Time Ovulation in Mares. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP 1997*, Vol. 43/ 1, 189–191.

Samper, J. C. (2007). How to Interpret Endometrial Edema in Brood Mares. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP 2007*, Vol. 53/20, 571–572.

Samper, J. C. (2008). Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and others do not. *Theriogenology*, 70(3), 445–447. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.040>

Samper, J. C. (2009). Equine Breeding Management and Artificial Insemination. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-5234-0.X0001-3>

Samper, J. C. (2010). A review of a practitioner’s perspective on endometrial edema. *Pferdeheilkunde*, 26(1), 14–18. <https://doi.org/10.21836/PEM20100103>

Shrestha, H. K., Beg, M. A., Burnette, R. R., & Ginther, O. J. (2012). Plasma clearance and half-life of prostaglandin F2alpha: A comparison between mares and heifers. *Biology of Reproduction*, 87(1), 18. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.100776>

Sirois, J., Betteridge, K. J., & Goff, A. K. (1987). PGF-2 alpha release, progesterone secretion and conceptus growth associated with successful and unsuccessful transcervical embryo transfer and reinsertion in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 35, 419–427.

Squires, E. L., Iuliano, M. F., & Shideler, R. K. (1982). Factors affecting the success of surgical and nonsurgical equine embryo transfer. *Theriogenology*, 17(1), 35–41. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(82\)90113-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(82)90113-3)

Squires, E. L., McCue, P. M., & Vanderwall, D. (1999). The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, 51(1), 91–104. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00234-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00234-9)

Stout, T. A. E. (2006). Equine embryo transfer: Review of developing potential. *Equine Veterinary Journal*, 38(5), 467–478. <https://doi.org/10.2746/042516406778400529>

Thompson, R. L., Gunn, A. J., Stephen, C. P., Ip, H., & Brookes, V. J. (2018). Assessment of uterine luminal pH in mares and the effect of dilute vinegar lavage on uterine luminal pH and endometrial health. *Theriogenology*, 117, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.014>

Townson, D. H., Pierson, R. A., & Ginther, O. J. (1989). Characterization of plasma progesterone concentrations for two distinct luteal morphologies in mares. *Theriogenology*, 32(2), 197–204. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(89\)90310-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(89)90310-5)

Vanderwall, D. ., Betschart, R. ., & Squires, E. . (1999). *Effect of PGF2α and 13,14-*

“Efectos del lavaje embrionario sobre valores séricos de progesterona en yeguas raza árabe donantes de embriones” MV. Rubio, M. Soledad.

dihydro-15-keto-PGF2 α (PGFM) on corpora luteal function in nonpregnant mares. 19, 1–5.

- Vanderwall, D. K., & Ball, B. (2000). Current Equine Embryo Transfer Techniques. *Recent Advances in Equine Reproduction*, 8.
- Weber, J. A., Causey, R. C., & Emmans, E. E. (2001). Induction of luteolysis in mares by ultrasound-guided intraluteal treatment with PGF2alpha. *Theriogenology*, 55(9), 1769–1776. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00519-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00519-2)
- Weems, C. W., Weems, Y. S., & Randel, R. D. (2006). Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Veterinary Journal*, 171(2), 206–228. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.11.014>
- Wilde, M. H., Dinger, J. E., Hoagland, T. A., Graves-Hoagland, R. L., & Woody, C. O. (1989). The effects of cervical dilation on plasma PGFM, progesterone and the duration of luteal function in diestrous mares. *Theriogenology*, 32(4), 675–681. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(89\)90288-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(89)90288-4)
- WILSHER, S., & ALLEN, W. R. (2004). An improved method for nonsurgical embryo transfer in the mare. *EQUINE VETERINARY EDUCATION*, 15(16), 39–44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2004.tb00265.x>
- Wilsher, S., De Rijck, M., & Allen, W. R. (2021). Post fetal death development of endometrial cups in a Jenny donkey (*Equus asinus*). *Equine Veterinary Education*, 33(11), e416–e422. <https://doi.org/10.1111/eve.13353>
- Wilsher, S., Newcombe, J. R., Ismer, A., Duarte, L., Kovacsy, S., & Twink Allen, W. R. (2022). The effect of embryo reduction and transfer on luteostasis in the mare. *Animal Reproduction Science*, 242(February), 107002. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107002>