

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS PECUARIAS

**EFFECTO DE DOS PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE
SEMEN SOBRE LOS RESULTADOS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL
EQUINA**

ASESOR:
PROF. ALEX SOLÍS CORRALES, DVSc

ESTUDIANTE:
CARLOS FERNANDO FUENTES LEZCANO

4-784-2156

DAVID, CHIRIQUÍ
REPÚBLICA DE PANAMÁ

2022

EFFECTO DE DOS PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN SOBRE LOS RESULTADOS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EQUINA

TRABAJO DE TESIS SOMETIDO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS PECUARIAS**

PERMISO DE PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL DEBE SER OBTENIDA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

APROBADO:

Prof. Alex Solís Corrales, DVSc.

DIRECTOR

Prof. Reinaldo de Armas, PhD.

COMITÉ

Prof. Neftalí Aparicio Ruíz, MSc.

COMITÉ

**DAVID, CHIRIQUÍ
REPÚBLICA DE PANAMÁ**

2022

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mis pilares fundamentales, que siempre confiaron en mí, me ofrecieron la oportunidad de estudiar y quienes siempre me motivaron a no desistir y seguir adelante: mis padres Nuris E. Lezcano F.; Carlos F. Fuentes y mi hermano Kevin J. Fuentes L. Sus consejos y palabras de aliento me han llevado hasta donde estoy hoy.

También dedico este trabajo a una persona muy especial que conocí en esta etapa universitaria, que no solo ha sido una amiga sino como una hermana; que siempre me apoyó en la culminación de este proyecto: *Stephania Samudio (Fanny)*, gracias por tus buenos deseos y consejos, se te quiere infinitamente. Gracias por formar parte y estar siempre en los momentos más importantes de mi vida como lo fue la realización y sustentación de esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, le doy gracias a Dios, la honra y la gloria sean para él; por haberme guiado y dado la sabiduría en la realización de esta investigación.

Seguidamente a mi amigo Félix Contreras, por ser como un hermano y haberme tomado en cuenta en la realización de esta investigación, brindarme su apoyo en todo momento y recibirme en su hogar como un familiar más.

Agradezco a mis verdaderos amigos que me que dio la Facultad de Ciencias Agropecuarias.: Ansella Patiño, Lía Muñoz, Stephania Samudio, Gerson Olivares, Carolina Ibarra, Algis Sánchez, Franklin Montezuma, Luis González; que siempre me motivaron a seguir adelante a pesar de que la realización de esta investigación no fue sencilla.

A Liseth Morales, gracias por todo el cariño brindado y apoyo incondicional a lo largo de esta trayectoria.

A la Ingeniera Yasmín L. García C. por brindarme su amistad, confianza y apoyo en todo momento.

Finalmente, a mi director de tesis Dr. Alex Solís Corrales, por su apoyo, profesionalismo, dedicación y compromiso con la realización de esta investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo General	4
2.2. Objetivos Específicos	4
III. HIPÓTESIS	5
IV. MARCO TEÓRICO	6
4.1. Anatomía reproductiva de la yegua	6
4.2. Fisiología reproductiva de la yegua no gestante	10
4.2.1. El ciclo estral	10
4.2.2. Foliculogénesis y ovulación en la yegua	11
4.2.3. Sincronización del estro en la yegua	12
4.2.3.1. PROSTAGLANDINA F ₂ alfa (PGF ₂ α)	12
4.3. Agentes inductores de la ovulación en yeguas	13
4.3.1. Gonadotropina coriónica humana (hCG)	13
4.3.2. Hormonas liberadoras de gonadotropina y agonistas liberadoras de gonadotropina.	15
4.3.3. LH equina recombinante (reLH)	15
4.4. Criopreservación del semen equino	16
4.4.1. Centrifugación estándar	16
4.4.2. Centrifugación empleando un medio amortiguador.	17
4.4.3. Centrifugación coloidal	17
4.5. Técnicas de inseminación	17
4.5.1. Inseminación en el cuerpo uterino o inseminación convencional	18
4.5.2. Inseminación de cuerno profundo guiada rectalmente (RGDHI)	18
4.5.3. Inseminación endoscópica de cuerno profundo (EDHI)	19
4.6. Dosis y frecuencia de inseminación	20

4.7. Reconocimiento materno de la preñez en la yegua	21
4.8. Diagnóstico reproductivo por ecografía en yeguas	22
V. MARCO METODOLÓGICO	24
5.1. Lugar de estudio	24
5.2. Animales experimentales	24
5.3. Sincronización de celo e inducción de la ovulación	25
5.4. Inseminación artificial y diagnóstico de preñez	25
5.5. Análisis estadístico	27
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
VII. CONCLUSIONES	36
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Datos del semen postdescongelación para la IA.	27
Cuadro 2. Diseño del Experimento.	28

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Tasas de preñez obtenidas por tratamientos.	29
-------------------------------------------------------	----

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1. Tasas de preñez obtenidas en cada tratamiento empleado.	30
------------------------------------------------------------------	----

EFFECTO DE DOS PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN SOBRE LOS RESULTADOS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EQUINA

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dos protocolos de criopreservación de semen sobre los resultados de inseminación artificial equina. En un primer protocolo se criopreservó semen empleando una centrifugación de 600 g por 11 minutos y en un segundo protocolo se criopreservó semen a 750 g por 8 minutos. Estos protocolos correspondieron al tratamiento uno y dos respectivamente. Se utilizaron 13 yeguas de la raza Cuarto de Milla, en edades entre 4 a 8 años. La condición corporal de las mismas era aproximadamente entre 6 y 7 (en escala de 1 a 9). Se realizaron 13 inseminaciones con semen criopreservado (T1: 7 inseminaciones con semen de 600 g por 11 minutos y T2: 6 inseminaciones con semen de 750 g por 8 minutos). Los datos fueron ordenados en una tabla de contingencia. Para el análisis estadístico se llevó a cabo la prueba de Chi Cuadrado, utilizando el programa IBM SPSS Statistics versión: 29.0.0.0 (241), donde se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) para las tasas de preñez cuando se empleó el semen criopreservado en el T1 sobre el T2 (T1: 71.40% y T2: 16.70%). Se concluye que el semen criopreservado en el T1 ofreció las mejores tasas de preñez utilizando una inseminación artificial a tiempo fijo.

PALABRAS CLAVES: Semen equino, congelación de semen, yegua, sincronización del celo, estro, folículo preovulatorio, ovulación, inseminación intracornual, tasas de preñez, ultrasonografía.

EFFECT OF TWO SEMEN CRYOPRESERVATION PROTOCOLS ON THE RESULTS OF EQUINE ARTIFICIAL INSEMINATION.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of two semen cryopreservation protocols on the results of equine artificial insemination. In a first protocol, semen was cryopreserved using a centrifugation of 600 g for 11 minutes and in a second protocol, semen was cryopreserved at 750 g for 8 minutes. These protocols corresponded to treatment one and two, respectively. Thirteen Quarter Horse mares, aged 4 to 8 years, were used. The body condition of the mares was approximately between 6 and 7 (on a scale of 1 to 9). Thirteen inseminations were performed with cryopreserved semen (T1: 7 inseminations with 600 g semen for 11 minutes and T2: 6 inseminations with 750 g semen for 8 minutes). The data were arranged in a contingency table. For the statistical analysis, the Chi-Square test was performed, using IBM SPSS Statistics version: 29.0.0.0 (241), where significant differences ($P < 0.05$) were found for pregnancy rates when cryopreserved semen was used in T1 over T2 (T1: 71.40% y T2: 16.70%). It is concluded that semen cryopreserved at T1 offered the best pregnancy rates using fixed-time artificial insemination.

KEYWORDS: Equine semen, freezing semen, mare, estrus synchronization, estrus, preovulatory follicle, ovulation, deep horn insemination, pregnancy rates, ultrasonography.

I. INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) con semen congelado implica la introducción oportuna de una cantidad adecuada de espermatozoides en el útero de la yegua (Samper, Estrada y McKinnon, 2007).

La IA es una base para otras biotecnologías que van desde la transferencia de embriones hasta la clonación. Durante décadas, la investigación sobre la IA se ha centrado en el ganado Bovino, pero durante los últimos 35 años, esta biotecnología ha ganado cada vez más popularidad en la cría de caballos.

Durante la última década, se han logrado importantes logros en el procesamiento, congelación y la inseminación con semen equino congelado. Este progreso se ha asociado con el uso de nuevas técnicas de IA, como la inseminación intracornual, nuevos diluyentes disponibles que dan como resultado una mejor criosupervivencia de los espermatozoides y técnicas de selección de esperma para aumentar la calidad del semen congelado (Alvarenga *et al.*, 2016).

Al parecer, los dos factores de mayor relevancia hacen referencia al semen empleado en el momento de la IA, así como el sitio de inseminación (Metcalf, 2007), pues a pesar de que la fertilidad de la yegua y su manejo reproductivo son factores claves en el establecimiento de gestaciones, es importante suministrar semen de buena calidad para la IA (Samper, 2008; Vidament *et al.*, 1997).

Al igual que en la monta natural, la longevidad de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo de la yegua y el período de viabilidad del óvulo, determinarán el momento óptimo de la inseminación (Olguín y Esquivel, 2011).

Debido a estos factores es importante tener en cuenta la influencia de un buen proceso de criopreservación, para así preservar la capacidad fecundante del semen equino (Restrepo *et al.*, 2012). Es por esto que se han desarrollado diferentes agentes criopreservantes que mantienen la viabilidad de las células espermáticas después del proceso de congelación y descongelación, y que han demostrado buenas tasas de preñez (Miller, 2008).

Además, el manejo reproductivo de la yegua para IA con semen congelado puede ser costoso, y predecir el momento exacto de la ovulación es un desafío (Immonen y Cuervo-Arango, 2018), por lo cual se considera conveniente inducir la ovulación cuando la yegua presenta un folículo \geq o igual a 35mm, y realizar la IA 24 a 48 horas después (Alonso *et al.*, 2016).

El sitio de inseminación juega un rol importante sobre las tasas de preñez, en la actualidad la inseminación de cuerno profundo ipsilateral al ovario donde se encuentra el folículo preovulatorio es una técnica segura para ser utilizada en la yegua siempre y cuando se realice de forma correcta (Lazcano y Pereyra, 2020).

Dicha técnica es la más recomendada cuando se insemina con semen congelado, ya que la criopreservación precapacita a los espermatozoides y reduce su capacidad de fertilización a un lapso aproximado de 6 horas post IA, por lo tanto, es necesario inseminar sobre la ovulación (Alonso *et al.*, 2016).

Las tasas de preñez en yeguas inseminadas con semen congelado varían, pero en promedio se encuentran alrededor del 50% (Sánchez *et al.*, 2009). Sin embargo, Loomis (2001), señala que se pueden obtener tasas de preñez con semen congelado similares a las obtenidas con semen enfriado, pues, en un estudio realizado por este autor inseminando yeguas con semen enfriado (74,7% de preñez) fueron similares a las de semen congelado (75,6% de preñez).

Los protocolos de criopreservación varían ampliamente entre los diferentes laboratorios, los resultados en cuanto a la evaluación posterior a la descongelación también son variables y, aún más, las tasas de preñez cuando se inseminan yeguas; ya que intervienen más factores no relacionados directamente con el protocolo de criopreservación (Castro y Chacón, 2016).

Diversos investigadores reportan que la centrifugación, genera daños mecánicos sobre los espermatozoides equinos, los cuales dependen de la duración y fuerza con que sea ejecutada (Ramires-Neto *et al.*, 2013). En un estudio realizado por (Alvarenga *et al.*, 2012), determinaron que la menor pérdida de células espermáticas, por daños asociados a la centrifugación, se presentó a 600 g durante 10 minutos que cuando centrifugaron a 1000 g durante 20 minutos.

Esto fue corroborado por Love *et al.*, (2012), donde centrifugaron semen a 1000 g durante 20 minutos, y observaron una reducción en la movilidad y en la velocidad de los espermatozoides. Al respecto (Mari *et al.*, 2015), señalaron que una alta fuerza de centrifugación, es perjudicial para la integridad de los espermatozoides.

De acuerdo a lo anterior, es importante continuar evaluando alternativas de centrifugación que conduzcan a una máxima recuperación celular, condicionada a la menor reducción posible en la integridad y la funcionalidad de los espermatozoides equinos (Restrepo *et al.*, 2016).

Es por esto que este trabajo de investigación presenta los objetivos que se describen a continuación:

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- ✓ Evaluar el efecto de dos protocolos de criopreservación de semen equino que emplean distintas gravedades y tiempo de centrifugación, sobre los resultados de la inseminación artificial equina.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Comparar las tasas de gestación de hembras inseminadas con semen criopreservado en dos protocolos con distintas gravedades y tiempos de centrifugación.
- ✓ Discutir los resultados alcanzados de acuerdo al método de inducción de la ovulación, tiempo de IA luego de la inducción de la ovulación y dosis de semen empleada en la IA.

III. HIPÓTESIS

Ha

Existen diferencias entre el efecto de dos protocolos de criopreservación de semen empleados sobre los resultados de inseminación artificial equina.

Ho

No existen diferencias entre el efecto de dos protocolos de criopreservación de semen empleados sobre los resultados de inseminación artificial equina.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1. Anatomía reproductiva de la yegua

El sistema reproductivo de la yegua está formado por dos grupos de órganos: (1) aquellas estructuras que son intrínsecas al tracto reproductivo (ovarios y genitales tubulares) y (2) aquellas que están físicamente aisladas del tracto reproductivo, pero juegan un papel en la regulación de los eventos reproductivos (por ejemplo: glándula pineal, retina, hipotálamo e hipófisis) Brinsko *et al.*, (2011a).

El tracto reproductivo consta de dos ovarios y un tracto tubular, que incluye los oviductos y cuernos uterinos emparejados, un solo cuerpo uterino, cuello uterino o cérvix, vagina, vestíbulo, vulva y clítoris (Brinsko *et al.*, 2011a; Evans, Constantinescu y Ganjam 2007; Real, 1990).

Ovarios

Los ovarios son los órganos principales que intervienen en la reproducción, funcionan como glándulas endocrinas al producir hormonas esteroideas, y como glándulas exocrinas citógenas al producir y liberar óvulos (Real, 1990). Anatómicamente los ovarios se encuentran en el área sub lumbar (ventral a la cuarta o quinta vértebra lumbar), suspendidos por ligamentos, y generalmente se encuentran a varios centímetros detrás del riñón correspondiente (Brinsko *et al.*, 2011a).

Los ovarios y los folículos son más grandes en la yegua que en otras especies de granja. Los ovarios equinos tienen forma de frijol y varían en tamaño según la actividad ovárica, la edad, la raza y la alzada (Real, 1990). Son en promedio de 6 a 8 cm (centímetros) de longitud, de 3 a 4 cm de altura y de 70 a 80 g (gramos) de peso (Brinsko *et al.*, 2011a).

En el ovario de la yegua la zona medular o vascular es superficial y la zona cortical (que contiene los folículos) está en el interior de la glándula. El tejido cortical alcanza la superficie solo en la depresión del borde ventral o libre. Esta, por lo tanto, es la única área desde la cual ocurre la ovulación normal y se denomina apropiadamente la fosa de ovulación (Brinsko *et al.*, 2011a; Evans *et al.*, 2007; Real, 1990).

La fosa de ovulación está cubierta por una capa de células poligonales cortas, que son un remanente del epitelio germinal primitivo. La papila de la ovulación del cuerpo lúteo no se proyecta desde la superficie convexa del ovario como lo hace en otras especies, sino que sobresale hacia la fosa de ovulación (Brinsko *et al.*, 2011a; Evans *et al.*, 2007).

Oviductos

Los oviductos (trompas de Falopio, trompas uterinas) son largos conductos tortuosos que miden de 20 a 30 cm de longitud cuando se extienden completamente y 2 a 3 milímetros de grosor en su extremo uterino; en su extremo ovárico se dilatan de 4 a 8 milímetros (Evans *et al.*, 2007; Real, 1990).

Los cilios están presentes en el epitelio del oviducto y producen una corriente dirigida hacia el útero. El oviducto se divide en tres partes: el infundíbulo (porción en forma de

embudo más cercana al ovario), la ampolla (porción media expandida) y el istmo (porción estrecha que conecta la ampolla con la asta uterina) Brinsko *et al.*, (2011a).

Útero

El útero consta de dos cuernos y un cuerpo singular. Se ha descrito que el útero tiene forma de T en la yegua, pero la forma de Y es probablemente una descripción más precisa del órgano cuando se ve dorsalmente en su posición natural en la yegua (Brinsko *et al.*, 2011a). El cuerpo uterino mide aproximadamente 20cm de largo y los cuernos entre 20 a 25cm de largo (Evans *et al.*, 2007; Real, 1990).

El útero es un órgano dinámico, que tiene varias funciones diversas. Facilita el transporte de espermatozoides a las trompas uterinas, el desarrollo embrionario y fetal óptimo depende de un ambiente uterino apropiado (Evans *et al.*, 2007).

Cérvix

La cérvix o cuello uterino es una estructura de paredes gruesas y lumen reducido que forma una barrera entre el útero y el medio externo; su longitud es de 5 a 7.5 cm y su diámetro de 3 a 4 cm (Real, 1990).

El cuello uterino es un órgano dinámico en la yegua. Está revestido internamente por células secretoras que contienen epitelio que producen un moco delgado para servir como lubricante durante el estro y un moco espeso para ocluir la luz cervical durante el diestro y la gestación, de modo que sea menos permeable a las bacterias y a los materiales extraños (Brinsko *et al.*, 2011a).

Vagina

La vagina es un órgano tubular que se extiende horizontalmente de 15 a 20 cm a través de la cavidad pélvica desde el orificio externo del cuello uterino hasta el pliegue transversal que recubre el orificio uretral externo (Evans *et al.*, 2007). A diferencia del útero, el cuello uterino y el vestíbulo la lámina propia de la vagina está bien vascularizada pero no contiene estructuras glandulares (Bergfelt, 2009).

Vestíbulo

Con frecuencia descrito como parte de la vagina, el vestíbulo se extiende de 10 a 12 cm desde el pliegue transversal que recubre el orificio uretral externo hasta la vulva, contiene glándulas vestibulares ventralmente que secretan moco para proporcionar lubricación al tracto tubular posterior (Evans *et al.*, 2007; Bergfelt 2009; Brinsko *et al.*, 2011a).

Vulva

La vulva, que generalmente incluye los labios (labios vulvares) y el clítoris, es la porción más caudal del tracto reproductivo y se considera la primera línea de defensa para proteger contra la contaminación del útero (Bergfelt, 2009).

La abertura vulvar vertical normalmente comienza de 5 a 7 cm directamente debajo del ano y tiene una longitud de 12 a 15 cm (Brinsko *et al.*, 2011a), aproximadamente dos tercios de la vulva se extienden caudoventralmente sobre el arco isquiático; por lo tanto, el paso seguro del antebrazo, la pipeta u otros instrumentos hacia el vestíbulo y la vagina se realiza en un ángulo hacia arriba (Evans *et al.*, 2007; Bergfelt, 2009).

Clítoris

El clítoris, un homólogo del pene, está ubicado en una cavidad craneal a la comisura ventral de la abertura vulvar. El músculo retractor del clítoris y el músculo constrictor vulvar son responsables de la inversión natural de los labios y la exposición del clítoris (“guiño del clítoris”) durante la micción o durante el estro conductual (Bergfelt, 2009; Brinsko *et al.*, 2011a).

4.2. Fisiología reproductiva de la yegua no gestante

4.2.1. El ciclo estral

El ciclo estral se define como el período desde una ovulación a una ovulación posterior (intervalo interovulatorio), cada ovulación se acompaña de signos conductuales de estro mientras que las concentraciones plasmáticas de progesterona permanecen bajas (<1ng/ml) (Brinsko *et al.*, 2011a).

El ciclo estral se divide en el proceso de ovulación y un período interovulatorio. También se puede considerar que el ciclo estral consiste en una fase folicular (estro) (en la cual la yegua es sexualmente receptiva al semental, y el tracto genital está preparado para aceptar y transportar esperma a los oviductos para la fertilización) que involucra el proceso de ovulación y una fase lútea (diestro) (en la cual la yegua no es receptiva al semental, y el tracto genital está preparado para aceptar y nutrir el conceptus) (Andrade Souza *et al.*, 2011; Brinsko *et al.*, 2011; Bergfelt, 2009).

4.2.2. Foliculogénesis y ovulación en la yegua

El folículo es la unidad estructural y funcional de los ovarios. La foliculogénesis se define como el proceso de formación, crecimiento y diferenciación folicular, abarca desde el estadio de folículo primordial hasta el de folículo preovulatorio (Gigli, Russo & Agüero, 2006).

Las yeguas nacen con un grupo finito de folículos primordiales, se ha estimado que existe un grupo de reserva de aproximadamente 36,000 folículos primordiales en la yegua (en contraste con más de 120,000 folículos primordiales en la vaca) y que en cualquier momento durante la temporada ovulatoria, 100 (frente a 300 en la vaca) folículos primordiales han abandonado el grupo de reserva y han entrado en el grupo activo de folículos y están experimentando crecimiento y diferenciación (Evans *et al.*, 2007).

La ovogénesis es el proceso de formación y desarrollo del ovocito. Comienza con las ovogonias, que derivan de las células germinales primordiales en el embrión y culmina con la formación de ovocito II (ovulación) Gigli *et al.*, (2006).

La ovulación en la yegua es un proceso complejo que involucra una secuencia de eventos que conduce a la ruptura de un folículo dominante (>30mm) en la fosa de ovulación y la extrusión del líquido folicular, células de la granulosa y el complejo cúmulo/ovocitos (Bergfelt y Adams, 2007).

4.2.3. Sincronización del estro en la yegua

La sincronización estral en la yegua es más relativa y no produce resultados tan confiables como la sincronización estral en el ganado bovino (Card, 2009), debido a que la duración del celo en la yegua es de 5 a 7 días, y el momento de la ovulación en relación con el final del celo varía, ocurriendo la ovulación en los últimos 2 días del celo en el 69 % de las yeguas y después del final del celo en el 14 % de las yeguas (Bradecamp, 2007). Estos factores dificultan el desarrollo de un programa de sincronización que permita realizar una sola monta o inseminación en un momento predeterminado.

El método más típico para sincronizar e inducir el estro en la yegua es la finalización de la fase lútea del ciclo estral con un análogo de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Pinto y Meyers, 2007).

4.2.3.1. PROSTAGLANDINA F_2 alfa ($\text{PGF}_{2\alpha}$)

De las especies domésticas estudiadas, la yegua es la más sensible, en base a peso corporal, a los efectos luteolíticos de la administración sistémica (intramuscular o subcutánea) de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Tal administración es tan eficaz para causar la luteólisis en yeguas intactas como histerectomizadas, lo que indica que el principal sitio de acción de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ no se encuentra a nivel del útero (Hafez, 1989).

Las prostaglandinas son hormonas de ácidos grasos con una amplia variedad de aplicaciones clínicas en la reproducción equina. En la mayoría de las aplicaciones, se usan para inducir la lisis del cuerpo lúteo o para estimular las contracciones uterinas (Samper, 2008; McCue y Ferris, 2015).

En las yeguas, el inicio del estro se induce de manera rutinaria después de una dosis luteolítica de un análogo de prostaglandina $F_{2\alpha}$, las yeguas en diestro con un cuerpo lúteo maduro y funcional responderán entrando en el estro 3 a 4 días después de la inducción (Samper, 2008; Metcalf y Thompson, 2010).

4.3. Agentes inductores de la ovulación en yeguas

Un agente inductor de la ovulación se administra comúnmente a las yeguas en celo para estimular la ovulación dentro de un periodo definido (McCue, Magee y Gee, 2007). La administración de un agente inductor de la ovulación en un momento apropiado del celo típicamente avanzará la ovulación entre 1 y 2 días antes de la ovulación espontánea esperada (McCue, 2014c).

Por lo tanto, la inducción de la ovulación permite una predicción precisa del tiempo de ovulación y facilita el manejo del apareamiento o la inseminación cuando la disponibilidad de esperma es problemática (Chavatte y Palmer, 1998).

Actualmente hay tres productos disponibles: gonadotropina coriónica humana (hCG), deslorelina (análogo de GnRH) y reLH (LH equina recombinante).

4.3.1. Gonadotropina coriónica humana (hCG)

La gonadotropina coriónica humana (hCG) es una gran hormona glicoproteica producida por las células citotrofoblásticas de la placenta humana con actividad biológica similar a la Hormona Luteinizante (LH) McCue y Ferris (2015).

Actualmente es uno de los agentes de inducción de la ovulación más rentables y de uso más frecuente en la industria equina (Samper, 2008; Barbacini *et al.*, 2010; McCue y Ferris, 2015; Tazawa *et al.*, 2017).

La dosis utilizada de este agente inductor de la ovulación varía entre 1500 a 3300 UI (Samper, 2008). Sin embargo, la eficacia para inducir una ovulación programada puede reducirse si se administra hCG repetidamente durante la misma temporada de reproducción (McCue y Ferris, 2015).

En un estudio realizado, utilizando diferentes dosis de hCG (500, 1500 y 2500 UI), obtuvieron que los intervalos medios desde el tratamiento hasta la ovulación fueron similares en el grupo de 2500 UI (43.5 ± 1.0 horas) y el grupo de 1500 UI de hCG (44.0 ± 1.0 horas) y más cortos que los observados para el grupo de 500 UI de hCG (82.6 ± 8.5 horas) Gastal *et al.*, (2006).

La razón por la cual, la ovulación en las yeguas ocurre dentro de las 36 a 48 horas después de la aplicación de hCG es debido a que se da una disminución inmediata del 17β - estradiol y un aumento más rápido de la LH (Ginther *et al.*, 2009).

Además, el tratamiento con hCG está asociado con la interrupción de la tasa de crecimiento del folículo preovulatorio concurrentemente con la reducción de la concentración de estradiol sistémico y la puntuación de la ecotextura endometrial (Dolezel *et al.*, 2012; Tazawa *et al.*, 2017).

Por otra parte, una inyección única de hCG es eficaz, no solo para inducir la ovulación, sino que también aumenta la probabilidad de gestación a los 14 días después de la ovulación (Grimmett y Perkins, 2001; Fernández *et al.*, 2008).

4.3.2. Hormonas liberadoras de gonadotropina y agonistas liberadoras de gonadotropina.

La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) es una hormona peptídica de 10 aminoácidos producida en el hipotálamo. Los agonistas de GnRH, como la deslorelina, la buserelina y la historelina, se administran para estimular la actividad folicular en yeguas en anestro e inducir la ovulación en yeguas ciclando (Samper, 2008).

En un estudio reportaron que la administración de acetato de deslorelina (36.6 horas) muestra un mejor desempeño que la hCG (45.6 horas) debido a un menor tiempo de espera entre la inducción de la ovulación, con la diferencia de 9 horas a favor del grupo 1, y fue más precisa en ovulación, que fue muy importante en la Inseminación Artificial (Figueiredo *et al.*, 2011),

Por otra parte, La deslorelina se puede usar para inducir la ovulación en yeguas que no ovulan en respuesta a la hCG, y el uso repetido de deslorelina durante múltiples ciclos de celo no provoca una respuesta inmune ni disminuye su eficacia (McCue y Ferris, 2015).

4.3.3. LH equina recombinante (reLH)

La LH equina recombinante es una gonadotropina monocatenaria de menor peso molecular que la hCG de dos cadenas y, por lo tanto, mucho menos antigénica (Samper, 2008).

La eficacia de la hormona luteinizante equina recombinante (reLH) para acortar el tiempo de ovulación es equiparable a los alcanzados con hCG. En un estudio realizado donde se aplicaron dosis de 0.75 y 0.9 mg de reLH dieron como resultado tasas de

ovulación del 90% y 80%, que fueron similares al tratamiento con hCG (85.7%) con una aplicación de 2500 UI (Yoon *et al.*, 2007).

4.4. Criopreservación del semen equino

La criopreservación del semen permite conservar y almacenar material genético por largos periodos de tiempo (Castro y Chacón, 2016). Este procedimiento implica el almacenamiento de los espermatozoides a temperaturas bajo cero, utilizando fundamentalmente el Nitrógeno Líquido (-196°C) Brinsko y Varner (1992).

Antes de criopreservar el semen equino este se debe centrifugar para eliminar el plasma seminal que se ha contaminado con orina durante la recolección de semen y para concentrar los espermatozoides en un sedimento (Bradecamp, 2014a).

Existen tres técnicas para realizar la centrifugación del semen equino: centrifugación simple o estándar (CS), centrifugación empleando un medio amortiguador y centrifugación en coloides de silicato (Percoll).

4.4.1. Centrifugación estándar

En esta centrifugación el eyaculado se diluye en volumen 1:1 con un extensor de semen comercial y se divide el volumen en partes iguales entre los tubos de centrifugación, el extensor de semen ayuda a mantener la viabilidad de los espermatozoides durante la centrifugación (Bradecamp, 2014a). Dicha técnica es la más económica.

4.4.2. Centrifugación empleando un medio amortiguador.

La centrifugación de semen se puede realizar con o sin la ayuda de un medio amortiguador, el cual es una solución que contiene iodixanol (Sieme *et al.*, 2006). El propósito del amortiguador es permitir que el semen se centrifugue a una fuerza g más alta para maximizar el porcentaje de esperma recolectado después de la centrifugación sin tener un efecto perjudicial sobre la viabilidad del esperma (Bradecamp, 2014b).

4.4.3. Centrifugación coloidal

La centrifugación coloidal de una sola capa es un proceso mediante el cual el semen del semental se pasa a través de una solución de partículas de sílice coloidal y silanizada (Percoll) durante la centrifugación para seleccionar esperma con buena motilidad, morfología y calidad de cromatina mediante el uso de una técnica coloidal de una sola capa (Bradecamp, 2014c).

No existen grandes diferencias en la motilidad de los espermatozoides empleando las técnicas antes mencionadas, pero tanto la técnica que emplea un medio amortiguador y la que emplea gradientes de Percoll si permiten obtener mejor calidad seminal en cuanto a morfología e integridad de los espermatozoides (McCue, 2014e)

4.5. Técnicas de inseminación

Las distintas técnicas de IA afectan el transporte espermático y la reacción inflamatoria postinseminación, por lo tanto, la técnica de IA será determinada por el número y costo de la dosis de semen disponibles, estatus de la yegua a inseminar y la fertilidad del semen congelado (Cazales, Estradé y Mattos, 2020).

Hoy en día, existen tres técnicas comunes para inseminar yeguas con semen congelado: inseminación en el cuerpo uterino o inseminación convencional, inseminación de cuerno profundo guiada rectalmente (RGDHI) e inseminación endoscópica de cuerno profundo (EDHI) Sánchez *et al.*, (2009).

4.5.1. Inseminación en el cuerpo uterino o inseminación convencional

La inseminación en el cuerpo uterino es la técnica más común y consiste en depositar el semen en la parte caudal del cuerpo uterino con la utilización de un catéter que pasa a través del cuello uterino (Sánchez *et al.*, 2009). Después de aplicar un vendaje de cola y limpiar el área perineal, se inserta una mano en la vagina y se localiza el cuello uterino, el dedo índice se inserta en el cuello uterino, y se pasa un catéter de inseminación a través de la vagina, luego a lo largo del dedo índice y así hasta el útero (Parkinson & Morrel, 2019).

Las principales desventajas de esta técnica son la necesidad de un mayor volumen y número de espermatozoides, lo que aumenta la reacción inflamatoria de la yegua y provoca un retraso en el transporte del esperma uterino; sin embargo, la técnica es fácil y muy barata (Sánchez *et al.*, 2009).

4.5.2. Inseminación de cuerno profundo guiada rectalmente (RGDHI)

La inseminación de cuerno profundo guiada rectalmente es una técnica que se puede usar para administrar espermatozoides en la punta del cuerno uterino muy cerca de la unión útero tubárica (Dascanio, 2014). El procedimiento se usa con mayor frecuencia cuando el volumen de semen es bajo o cuando se insemina semen congelado y descongelado (McCue, 2014a).

La técnica de guía rectal comienza lavando el perineo a fondo, seguidamente se pasa una pipeta flexible de 65 cm de largo a través del cuello uterino y sube por el cuerno ipsilateral del ovario con el folículo ovulatorio (Sánchez *et al.*, 2009), una vez la pipeta se coloca en la ubicación deseada se realiza la inseminación (Dascanio, 2014).

La técnica de RGDHI guiada rectalmente tiene varias ventajas. Es barato y solo se necesitan dos personas. Con experiencia se puede realizar muy rápidamente y la mayor desventaja es que por descuido puede causar traumatismo en el útero o el recto durante la manipulación (Lyle y Ferrer, 2005).

4.5.3. Inseminación endoscópica de cuerno profundo (EDHI)

Al igual que con cualquier procedimiento vaginal, el área perineal se lava y desinfecta. Las yeguas que se inseminan mediante EDHI se deben sedar con tartrato de butorfanol (5 mg i.v.) junto con 150 mg de xilazina o 4 mg de detomidina (4 mg i.v.) y al igual que con RGDHI, se debe realizar la evacuación del recto (Samper, 2008).

La principal ventaja de la técnica de inseminación endoscópica de dosis baja es la visualización directa y la deposición precisa de un pequeño volumen de semen concentrado en la unión úterotubal (McCue, 2014d).

Las desventajas incluyen el costo inicial del videoendoscopio, el tiempo requerido para configurar, realizar y limpiar después del procedimiento, y la necesidad de contar con personal capacitado múltiple (Samper, 2008).

Quizás el mejor uso para este procedimiento es cuando se trata de un volumen muy bajo de semen (<0.5 ml) Miller (2008); Sánchez *et al.*, (2009). Aunque no hay una diferencia significativa en la tasa de preñez entre la técnica de dosis baja manual de

cuerno profundo y la técnica de inseminación endoscópica de dosis baja (McCue, 2014d; Dascanio, 2014).

4.6. Dosis y frecuencia de inseminación

No existe una dosis estándar de inseminación para el semen congelado y descongelado que se haya evaluado exhaustivamente en el caballo (Miller, 2008).

Aunque la dosis de inseminación probada con el tiempo ha sido de 500×10^6 espermatozoides progresivamente móviles por mililitro de semen (PMS/ml) tanto para semen fresco como enfriado, las mejoras en la composición del diluyente y el manejo de yeguas deberían permitir reducir las dosis convencionales al menos 100×10^6 (PMS/ml) Brinsko (2006).

Estudios realizados por Morris *et al.*, (2000), utilizando inseminación histeroscópica de pequeñas cantidades de espermatozoides en la unión úterotubal en yeguas preovulatorias determinaron que la deposición de 1.0×10^6 espermatozoides móviles sobre la papila úterotubal comenzó a acercarse al límite de una fertilización exitosa.

Estos mismos hallazgos fueron reportados por Hayden *et al.*, (2012) estos investigadores señalan que las tasas de preñez no se vieron afectadas significativamente, cuando se inseminaron 1 millón de espermatozoides, para histeroscopia (10/13, 77%) y transrectalmente (11/15, 73%) y de manera similar, cuando se inseminaron 0.5 millón de espermatozoides, las tasas de preñez para histeroscopia (3/15, 20%) y transrectalmente (4/13, 31%) estas disminuyeron.

La frecuencia de inseminación fue estudiada por Loomis y Squires (2005), donde determinaron que las tasas de preñez utilizando semen congelado no se vio afectada

cuando se inseminó una sola vez versus dos o tres veces (para ambos casos 47.1% de preñez). A similares conclusiones llegaron Sieme *et al.*; (2003) pues no encontraron grandes diferencias en la tasa de preñez utilizando una inseminación versus dos inseminaciones.

Metcalf (2007) recomienda que para el uso eficiente del semen congelado se debe programar la inseminación lo más cercano a la ovulación. No obstante Ribeiro *et al.*; (2015), aclaran que realizar dos inseminaciones a tiempo fijo reduce la frecuencia de ecografías en las yeguas. Todo dependerá de la disposición del semen y los gastos de los procedimientos de I.A.

4.7. Reconocimiento materno de la preñez en la yegua

El reconocimiento materno de la preñez en el caballo es la suma de eventos que conducen al mantenimiento de la preñez; en sentido estricto, se refiere al proceso fisiológico por el cual se prolonga la vida del cuerpo lúteo (Klein, 2016; Klein y Troedsson, 2011).

En las yeguas, el embrión migra hacia el útero entre los días 5 y 6 de la postovulación iniciando su movilidad por todos los segmentos uterinos, lo que es fundamental para el reconocimiento materno de la preñez (Brinsko *et al.*, 2011b), durante la fase de movilidad, la vesícula embrionaria muestra una tasa de crecimiento lineal hasta su fijación entre los días 15 y 17, cuando ocurre el fenómeno de orientación, desde la fijación hasta el día 28 de preñez, el crecimiento embrionario es menos evidente (meseta) mediante un examen ecográfico de corte transversal (Meira *et al.*, 2012).

Después de este período se restablece la tasa de crecimiento lineal hasta el día 46. Alrededor del día 20, el embrión propiamente dicho se visualiza como una mancha ecogénica en la cara ventral de la vesícula (Meira *et al.*, 2012).

Alrededor del día 38 de gestación, comienza la formación de las copas endometriales, y, en consecuencia, la síntesis de gonadotropina coriónica equina (eCG) induce la formación y desarrollo de cuerpos lúteos suplementarios, que son importantes para secretar progesterona y mantener la preñez hasta el día 120 aproximadamente (Meira *et al.*, 2012; Klein y Troedsson, 2011).

4.8. Diagnóstico reproductivo por ecografía en yeguas

Históricamente, la palpación por recto era la técnica principal para la determinación de la preñez, antes del advenimiento y uso clínico de la ecografía (Sitters, 2014).

En 1980, la ecografía en tiempo real se informó por primera vez como una modalidad de diagnóstico potencialmente valiosa en la disciplina de la reproducción equina (Echevarría, 2001), desde este informe original, las aplicaciones de la ecografía de diagnóstico en la reproducción equina se han expandido hasta el punto de que la ecografía se ha convertido en una herramienta fundamental e indispensable para los profesionales de las Ciencias Pecuarias como para los científicos investigadores (Brinsko *et al.*, 2011b).

Los equipos usados mayormente son de modo B y tiempo real. Modo B se refiere a la modalidad de diferentes grados de brillantez, imágenes en tiempo real son las que se presentan en movimiento continuo en el monitor (Echevarría, 2001).

Un sistema de ultrasonido en tiempo real en modo B consiste en un transductor que está conectado por un cable largo a una unidad base que contiene un monitor y un panel de control, el transductor transmite y recibe ondas de sonido de alta frecuencia para producir imágenes de tejidos y órganos en la pantalla del monitor (Brinsko *et al.*, 2011b).

Los tejidos varían en ecogenicidad (es decir, la capacidad de propagarse o reflejar ondas de sonido) por lo tanto, los tejidos altamente ecogénicos (hueso, tejido conectivo) aparecen blancos en el monitor y los líquidos no reflejan las ondas de sonido (son anecoicos), y aparecen como imágenes oscuras (Brinsko *et al.*, 2011b; Echevarría, 2001).

En la actualidad, el examen de ultrasonido del tracto reproductivo es la prueba más confiable para el diagnóstico de preñez (McCue, 2014a), además, el examen de ultrasonido es valioso en la detección temprana de preñez gemelar y detección de potencial patología ovárica o uterina (McCue, 2014b).

V. MARCO METODOLÓGICO

5.1. Lugar de estudio

Este estudio fue realizado en los distritos de David (corregimiento de Chiriquí) y San Lorenzo, provincia de Chiriquí. El primero ubicado a los 8°22'00'' de latitud norte y 82°18'00'' de longitud oeste, con una elevación promedio de 27 msnm, con una temperatura promedio anual de 32° C, humedad relativa de 80% y el segundo localizado a los 8°18'00'' de latitud norte y 82°06'00'' de longitud oeste, con una elevación de 32 msnm. La temperatura mínima es de 22 ° C y la temperatura máxima es de 33 ° C y una temperatura promedio de 24 ° C, humedad relativa promedio anual de 83.7% (ETESA, 2022).

5.2. Animales experimentales

Se utilizaron 13 yeguas de la raza Cuarto de Milla, con edades entre 4 y 8 años. La condición corporal de estas yeguas en promedio fue de aproximadamente entre 6 y 7 (en escala de 1-9) (Henneke *et al.*, 1983).

Las yeguas fueron evaluadas reproductivamente mediante ultrasonografía transrectal utilizando un ecógrafo marca SIUI®, modelo CTS-800 de transductor lineal de 7.5 MHz, para descartar patologías del sistema reproductor y diagnosticar actividad cíclica normal tomando como referencia la presencia de un cuerpo lúteo normal.

5.3. Sincronización de celo e inducción de la ovulación

Se procedió a sincronizar el celo de las yeguas empleadas y posteriormente a inducir la ovulación de las mismas. Para la sincronización de celo se utilizó un análogo de la hormona prostaglandina F₂ alfa (PGF₂α) (CICLASE DL®) y para inducir la ovulación se utilizó gonadotropina coriónica humana (hCG), (VETERIN CORION®). El protocolo utilizado se describe a continuación:

Día 0: Aplicación de 2cc de PGF₂α vía intramuscular (IM)

Día 3 a 4: Detección de celo exponiendo la yegua a un semental, una vez manifestados los signos característicos del celo, se procedió a dar seguimiento al tamaño del folículo preovulatorio empleando ultrasonografía.

Día 5 o 6: Si el folículo preovulatorio presentaba un tamaño \geq (mayor o igual) a 35mm (milímetros) se aplicaron 1500UI (Unidades Internacionales) de hCG para inducir la ovulación.

5.4. Inseminación artificial y diagnóstico de preñez

Las yeguas fueron inseminadas de 12 a 24 horas después ($19.69 \pm 7.43h$) de la aplicación de la hCG, utilizando semen criopreservado en dos protocolos que corresponden a dos tratamientos experimentales (T1: semen centrifugado a 600 g por 11 minutos y T2: semen centrifugado a 750 g por 8 minutos).

Para aplicar la técnica las yeguas fueron inmovilizadas con la ayuda de un brete, seguidamente se realizó una palpación mediante ultrasonografía para verificar el estado del folículo preovulatorio. Hecho esto se procedió a realizar el lavado y

secado de la vulva y periné de la yegua, y un vendaje de cola para facilitar el proceso de la IA.

La descongelación del semen se realizó a una temperatura de 37°C por 30 segundos. Seguidamente se vertió en un tubo cónico de 2ml, y por último fue eyectado con una jeringuilla de 3 ml. El semen se encontraba criopreservado en Nitrógeno líquido en pajuelas de 0.5ml (se utilizaron 4 pajuelas por inseminación), con una concentración de 400×10^6 /ml espermatozoides progresivamente motiles para ambos protocolos. Cada pajuela tenía una concentración de 200×10^6 /0.5ml, para obtener la concentración final por pajuela se multiplicó por la tasa de sobrevivencia para ambos tratamientos y por el número de pajuelas utilizadas por inseminación. Ver Cuadro 1, para tasa de sobrevivencia por tratamiento.

Para realizar la IA intracornual se empleó una pipeta de 65 centímetros de largo marca minitube® indicada para IA intracornual, donde primeramente se inserta una mano en la vagina para localizar el cuello uterino con el dedo índice, luego se pasa la pipeta a través de la vagina hasta el cuello uterino, se retira la mano de la vagina y se introduce por el recto previamente evacuado para guiar la pipeta hacia el cuerno ipsilateral al folículo preovulatorio, una vez logrado esto, se procedió a adaptar la jeringuilla con el semen a emplear y realizar la deposición del mismo. El diagnóstico de gestación se realizó a los 16 días postinseminación.

Cuadro 1. Datos del semen postdescongelación para la IA.

Protocolo de centrifugación	de Motilidad progresiva (%) Media y desviación estándar	Vigor espermático Escala (1-5)	Tasa de sobrevivencia (%) Media y desviación estándar
600 g por 11 minutos	70.83 ± 10.21	2.83 ± 0.4	46.67 ± 8.16
750 g por 8 minutos	71.67 ± 10.21	2.83 ± 0.4	56.67 ± 8.16

5.5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó una prueba de Chi-cuadrado(X^2), empleando el programa IBM SSPS Statistics Versión: 29.0.0.0 (241) Para determinar si existen diferencias significativas entre los resultados de preñez en las yeguas al utilizar semen criopreservado mediante dos protocolos.

Fórmula de Chi Cuadrado y descripción.

$$\chi^2 = \sum \frac{(fo - ft)^2}{ft}$$

X^2 = Chi-Cuadrado

Fo= Frecuencias observadas

Ft= frecuencias teóricas o esperadas.

El esquema del experimento se presenta a continuación: ver Cuadro 2

Cuadro 2. Diseño del Experimento.

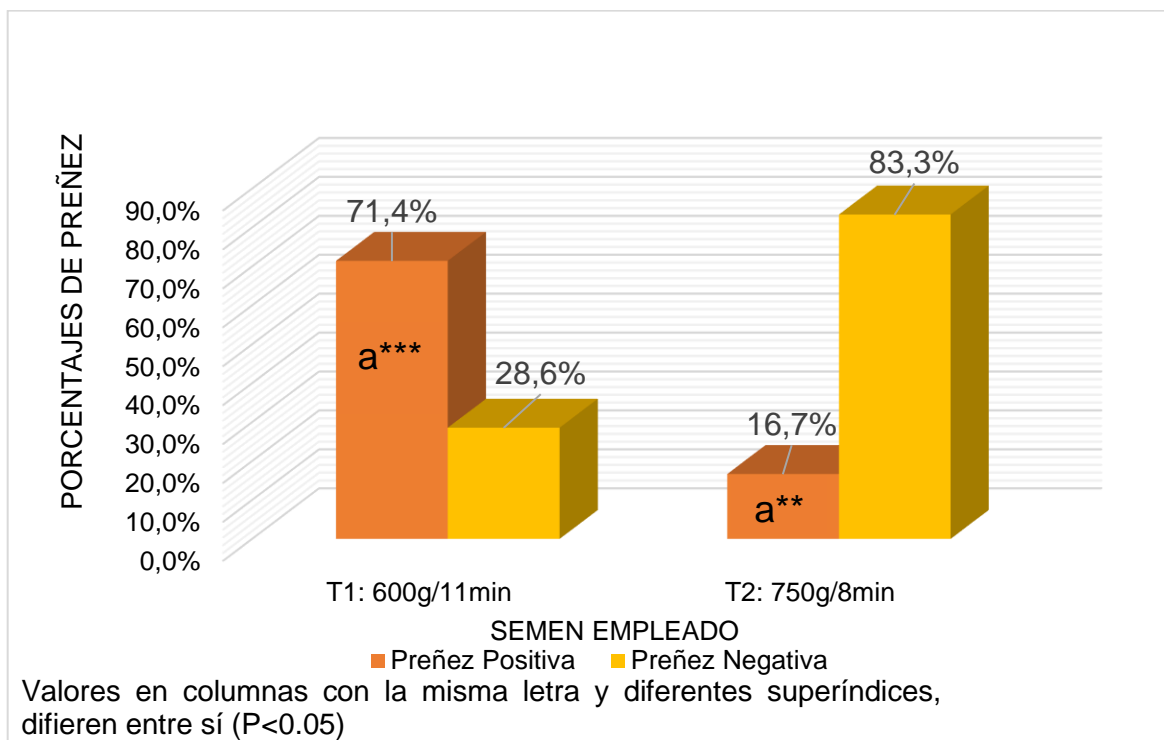
	Tratamiento	U.E.
Semen Empleado	T1: 600g/11 minutos	7
	T2: 750g/8 minutos	6
		13

U.E: Unidades Experimentales.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los porcentajes de preñez obtenidos utilizando semen criopreservado bajo dos protocolos diferentes, se pueden apreciar en la figura uno.

Figura 1. Tasas de preñez obtenidas por tratamientos.



Los mayores porcentajes de preñez en este trabajo se encontraron en el tratamiento uno en el cual se utilizó un semen criopreservado empleando una fuerza centrífuga de 600 g por 11 minutos mientras que en el tratamiento dos que se basó en el empleo de un semen criopreservado empleando una fuerza centrífuga de 750 g por 8 minutos estos porcentajes fueron menores.

Tabla 1. Tasas de preñez obtenidas en cada tratamiento empleado.

Tratamientos	n	Tasas de preñez	
		Positivas	Negativas
		%	%
1	7	71.4	28.6
2	6	16.7	83.3
Significación		P<0.05	

Valores en la misma columna con $P<0.05$ difieren entre sí.

Al analizar la Tabla 1 mediante la prueba estadística de Chi-cuadrado nos indica que existe una diferencia significativa ($p<0.05$) entre ambos tratamientos sobre los resultados de inseminación en las yeguas, favoreciendo así el tratamiento uno.

Los resultados de preñez para el caso de las yeguas inseminadas con el semen centrifugado a 600 g por 11 minutos (T1) fueron de 71.40% y para el semen centrifugado a 750 g por 8 minutos (T2) fue de 16.70%.

Las tasas de preñez en yeguas con semen congelado rondan entre el 30% a 60% Sánchez *et al.*, (2009), del 25% al 40% Oliveira *et al.*, (2013) o del 10% al 70% Alonso *et al.*, (2016). Estos resultados dependen mucho de la calidad del semen, fertilidad de la yegua, manejo correcto del protocolo de IA que se realice, además del volumen y dosis de semen (Sánchez *et al.*, 2009; Samper, 2001; Vidament *et al.*, 1997; Loomis, 2001).

Se han encontrado pocos trabajos que hacen énfasis en el efecto de la centrifugación de semen sobre los resultados en la inseminación artificial en yeguas, ya que en su mayoría se enfocan, en el efecto del método de IA y otros factores como el momento de la inducción de la ovulación.

Sin embargo, en nuestro tratamiento uno se alcanzaron resultados similares (71.4%) a los reportados por Pillet *et al.*, (2008) quienes obtuvieron porcentajes de preñez de 71%, utilizando una fuerza centrífuga muy parecida a la de este trabajo en el proceso de criopreservación de semen (600 g por 10 minutos).

Otros autores han reportado tasas de preñez muy variables utilizando semen centrifugado a una fuerza de 600 g por 10 min, como es el caso de Cerny *et al.*, (2012) donde encontraron 60% de preñez, Oliveira *et al.*, (2013) y Sielhorst *et al.*, (2016) con 40% de preñez.

En este trabajo se ha encontrado una disminución muy significativa en la tasa de preñez al utilizar un semen centrifugado a 750 g por 8 minutos, a pesar de que Contreras (2022), demostró que el mismo era de alta viabilidad incluso mejor que el centrifugado a 600 g por 11 minutos en cuanto a sobrevivencia espermática postdescongelación.

Al respecto, Restrepo *et al.*, (2016) afirman que incluso bajos niveles de fuerza de centrifugación logran alterar la movilidad espermática, la integridad del acrosoma y el potencial de la membrana interna mitocondrial de los espermatozoides equinos. Además, mencionan que estos daños se acentúan al incrementar las fuerzas y tiempos de centrifugación. Posiblemente los bajos resultados encontrados en este trabajo en el tratamiento dos, este asociado a lo antes mencionado.

Investigaciones de Morrell *et al.*, (2010) y Crespo *et al.*, (2013) han constatado que centrifugar el semen mediante la técnica de centrifugación coloidal (CC), permite recuperar semen con menores daños en el ADN, para la criopreservación. No obstante, en cuanto a la tasa de preñez Cerny *et al.*, (2012) no encontraron diferencias de este parámetro utilizando las técnicas de centrifugación estándar (CS) y centrifugación coloidal (CC). Para ambos casos 60% de preñez respectivamente.

Del mismo modo, se ha demostrado que utilizar altas fuerzas centrifugas al procesar un semen de baja viabilidad o de un semental considerado subfétil, puede disminuir incluso más los porcentajes de preñez, como es el caso de Sielhorst *et al.*, (2016) donde reportaron tasa de preñez de solo 10% utilizando un semen centrifugado a 1500 g por 15 minutos.

Alvarenga *et al.*, (2017); Alvarenga *et al.*, (2016); Alvarenga *et al.*, (2012); Loomis (2006); Dell`aqua *et al.*, (2001), plantean que un semen centrifugado a 600 g durante 10 minutos presenta los mejores parámetros seminales postdescongelación. Luego de comparar este protocolo con la tasa de preñez parece seguir siendo el protocolo más aceptado para la centrifugación de semen.

Relacionando estos factores Ribeiro *et al.*, (2015) demostraron que utilizar semen de un semental fértil, centrifugado a 600 g por 10 minutos en una inseminación artificial a tiempo fijo, que consistió en dos inseminaciones una vez inducida la ovulación (una a las 24 y otra 40h después de la inducción) se pueden obtener tasa de preñez de 80%. Backman *et al.*, (2004) encontraron porcentajes de hasta 70% realizando dos inseminaciones luego de la inducción de la ovulación (una a las 30 horas y la otra a las 52 h después).

En este trabajo con una sola inseminación realizada a las 19.69 ± 7.43 horas después de la inducción de la ovulación, se logró una tasa de preñez muy similar a la encontrada por estos investigadores realizando dos inseminaciones. Bajo un estricto seguimiento ecográfico una vez inducida la ovulación, para realizar la I.A lo más cercano a la ovulación. Alonso *et al.*, (2016) reportaron tasas de preñez similares a la de esta investigación.

Otros factores un poco complejos de relacionar es la dosis y el sitio de inseminación. Según Cazales *et al.*, (2020) para una IA en el cuerpo uterino la dosis establecida en 250 millones de PMS (espermatozoides progresivamente motiles), sin embargo, Brinsko (2006) señala que las dosis de inseminación para semen congelado deben ser aproximadamente de 500 millones PMS.

Fernández *et al.*, (2008) utilizaron 1000 millones de PMS, reportando tasas de preñez de 80%, no obstante, la dosis de inseminación dependerá también de la respuesta inflamatoria del útero de la yegua (Lazcano y Pereira, 2020; Kotilainen *et al.*, 1994).

En esta investigación empleando 400 millones de PMS, hemos obtenido tasas de preñez similares a las encontradas por Ribeiro *et al.*, (2015), Crowe *et al.*, (2008); Backman *et al.*; (2004) quienes emplearon parecidas dosis de inseminación (700 a 800 millones PMS). Es importante mencionar que estas altas tasas de preñez se obtienen siempre ligadas a un manejo estricto del proceso de IA.

Como se señaló anteriormente, en este trabajo se empleó hCG para inducir la ovulación luego de constatar la presencia de un folículo \geq a 35mm. Resultados similares a los nuestros fueron reportados por Figueiredo *et al.*, (2011), quienes no encontraron diferencias significativas en las tasas de preñez al realizar la inducción de la ovulación con hCG y GnRH (75% y 80% respectivamente), sin embargo, no utilizar un inductor de ovulación, disminuye las tasas de preñez hasta un 20% (Fernández *et al.*, 2008).

No obstante, estos resultados dependen estrictamente de la fertilidad de la yegua y el manejo del protocolo de IA, debido a esto es difícil predecir la fertilidad de un semental (Colenbrander, Gadella y Stout, 2003).

VII. CONCLUSIONES

La fuerza centrífuga empleada en los protocolos de criopreservación de semen puede afectar la viabilidad del mismo.

Emplear una fuerza centrífuga de 600 g por 11 minutos en los protocolos de criopreservación de semen permite obtener un semen capaz de alcanzar resultados satisfactorios en cuanto a las tasas de preñez de las hembras inseminadas.

La inducción de la ovulación empleando hCG luego de constatar la presencia de un folículo preovulatorio \geq a 35 milímetros, resulta conveniente para alcanzar buenos resultados en la IA.

Un tiempo de 12 a 24 horas transcurridas desde la inducción de la ovulación hasta la IA, es apropiado para lograr una tasa de preñez satisfactoria.

Una dosis de semen de 400 millones de espermatozoides por mililitro para realizar la IA, es conveniente para alcanzar resultados de preñes satisfactorios.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, A., Baca Castex, C., Pinto, M., Caldevilla, M., Ferrante, A., y Miragaya, M. (2016). Uso de semen congelado en programas de inseminación artificial en equinos. *Spermova*, 6(2), 107-109.
- Alvarenga M, A; Papa F, O; y Neto C, R. (2017). Técnicas para incremento da qualidade do sêmen de garanhões. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 41(1): 81-85.
- Alvarenga M.A., Papa F.O., y Neto, C.R. (2016). Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, 32(3), 521–530.
- Alvarenga M.A; Papa F.O; Carmo M.T; Kievitsbosch T; Manoela M; Chaves C; y Neto C.R. (2012). Methods of Concentrating Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(8), 424-429.
- Andrade Souza, F; Pérez Osorio, J; D'Oliveira Souza, A; Ribeiro do Vale Fihlo, V; Marc, H; Chacón J, L; y Arias, S.A. (2011). Foliculogénesis y ovulación en la especie equina. *Revista de Medicina Veterinaria*. (22), 43-50.
- Backman, T., Bruemmer, J. E., Graham, J.K., y Squires, E.L. (2004). Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. *Journal of Animal Science*, 82(3), 690-694.

- Barbacini, S; Zavaglia, G; Gulden, P; Marchi, V; y Necchi, D. (2010). Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. *Equine Veterinary Education*, 12(6), 312-317.
- Bergfelt, D.R. (2009). Anatomy and physiology of the mare. En Samper, J; *Equine Breeding Management and Artificial Insemination* (pp. 113-131). St. Louis, Missouri, Estados Unidos. Saunders Elsevier.
- Bergfelt, D.R., y Adams, G.P. (2007). Ovulation and corpus luteum development. En: Samper, J; Pycock, J & McKinnon, A. 1^{ra} edición. *Current Therapy in Equine Reproduction* (pp. 1-13). St. Louis, Missouri, Estados Unidos. Saunders Elsevier.
- Bradecamp, E.A. (2007). Estrous Synchronization. En: Samper, J; Pycock, J & McKinnon, A. 1^{ra} edición. *Current Therapy in Equine Reproduction* (pp. 22-25). St. Louis, Missouri, Estados Unidos. Saunders Elsevier.
- Bradecamp, E.A. (2014a). Centrifugation of Semen: Standard Technique. En J Dascanio and P.M. McCue. *Equine Reproductive Procedures* (pp. 424-428). Colorado, Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.
- Bradecamp, E.A. (2014b). Centrifugation of Semen: Cushion Technique. En J Dascanio and P.M. McCue. *Equine Reproductive Procedures* (pp. 429-432). Colorado, Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.
- Bradecamp, E.A. (2014c). Centrifugation of Semen: Selection of Motile Sperm Using a Single Layer Colloid Technique. En J Dascanio and P.M. McCue. *Equine*

Reproductive Procedures (pp. 433-435). Colorado, Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.

Brinsko S, P; Varner D, D. (1992). Artificial insemination and preservation of semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 8 (1): 205-218.

Brinsko, S. (2006). Insemination doses: How low can we go? *Theriogenology*. 66 (3), 543-550.

Brinsko, S; Blanchard, T; Varner, D; Schumacher, J; Love, C; Hinrichs, K; y Hartman, D. (2011a). Manipulation of Estrus in the Mare. En: Brinsko, S *et al.* 3^{ra} edición. Manual of Equine Reproduction (pp. 19-38). Maryland Heights, Missouri, Estados Unidos. Mosby Elsevier.

Brinsko, S; Blanchard, T; Varner, D; Schumacher, J; Love, C; Hinrichs, K; y Hartman, D. (2011b). Transrectal Ultrasonography in Broodmare Practice. En: Brinsko, S *et al.* 3^{ra} edición. Manual of Equine Reproduction (pp. 54-72). Maryland Heights, Missouri, Estados Unidos. Mosby Elsevier.

Card, C. (2009). Hormone therapy in the mare. En: Samper, J; Equine Breeding Management and Artificial Insemination (pp. 89-97). St. Louis, Missouri, Estados Unidos. Saunders Elsevier.

Castro, J.A.; y Chacón, L. (2016). Aspectos generales del proceso de conservación de semen equino: una revisión desde la congelación espermática ciencias veterinarias. *Conexión Agropecuaria*. 6(1): 45-64.

- Cazales Penino, N., Estradé, M.J., y Costa Matos, R. (2020). Inseminación artificial con semen congelado equino: reacción inflamatoria, transporte espermático y técnica de inseminación. *Veterinaria (Montevideo)*, 56(214), 1-8.
- Cerny, K.L., Hughes, S., Campos, J.R., Coleman, R.J., Troedsson, M.H.T., y Squires, E.L. (2012). Fertility of mares inseminated with frozen – thawed semen processed by single layer centrifugation through a colloid. *Journal of Equine Veterinary Science* 32(5), 289-291.
- Chavatte, P; y Palmer, E. (1998). Induction of ovulation in the mare. *Equine Veterinary Education*. 10 (1); 26-30.
- Colenbrander, B., Gadella, B.M., y Stout, T.A. (2003). The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(4), 305-311.
- Contreras, F.A. (2022). Evaluación de dos protocolos de criopreservación de semen equino. Tesis de pregrado. Universidad de Panamá (Panamá). Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Crespo, F., Gutiérrez-Cepeda, L., Gosalvez, J., Serres, C., y Johnston, S.D. (2013). Colloidal centrifugation of stallion semen results in a reduced rate of sperm DNA fragmentation. *Reproduction in Domestic Animals* 48(2), 23-25.
- Crowe, C.A., Ravenhill, P.J., Hepburn, R.J., y Shepherd, C.H. (2008). A retrospective study of artificial insemination of 251 mares using chilled and fixed time frozen-thawed semen. *Equine Veterinary Journal*, 40(6), 572-576.

- Dell'aqua J, A, Papa F, O, Alvarenga M, A., y Zahn, F. (2001). Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen. *Animal Reproduction Science* 68: 324–325.
- Dolezel, R; Ruzickova, K; y Maceckova, G. (2012). Growth of the dominant follicle and endometrial folding after administration of hCG in mares during oestrus. *Veterinarni Medicina*, 57(1); 36-41.
- Echevarría, L. (2001). La ecografía como técnica diagnóstica. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12(2), 185-186.
- Evans, T.J., Constantinescu, G.M., y Ganjam, V.K. (2007). Clinical Reproductive Anatomy and Phisiology of the Mare. En: Youngquist, R y Threlfall, W. *Current therapy in Large Animal Theriogenology* (pp. 47-67). St. Louis, Missouri, Estados Unidos. Saunders Elsevier.
- Fernández, F.; Hernández, J.; Rodríguez, S.; y Velásquez, H. (2008). Fertilidad en yeguas cuarto de milla tratadas con gonadotropina coriónica humana (hCG) utilizando semen congelado. *Revista de Salud Animal*, 30(3); 184-188.
- Figueiredo, T; Paiva, R; Ernandes, L; Kaercher, F; Romualdo, R; dos Santos, I; y Ricabone, P. (2011). Induction of Ovulation in Quarter Horse Mares Through the Use of Deslorelin Acetate and Human Chorionic Gonadotrophin (hCG). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(3), 517-521.
- Gastal, E; Silva, L; Gastal, M; y Evans, M. (2006). Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares. *Animal Reproduction Science*, 94(1), 186-190.

- Gigli, I., Russo, A., y Agüero, A. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *Investigación Veterinaria*, 8(1), 183-204.
- Ginther, O. J., Beg, M.A., Gastal, E.L., Gastal, M.O., y Cooper, D.A. (2009). Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17beta-estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. *Animal Reproduction Science*, 114(1-3), 311-317.
- Grimmett, J.B; y Perkins, N.R. (2001). Human Chorionic gonadotrophin: the Effect of dose on ovulation and pregnancy rate in Thoroughbred mares experiencing their first ovulation of the Breeding season. *New Zealand Veterinary Journal*, 49(3); 88-93.
- Hafez, E.S.E. (1989). Reproducción e inseminación artificial en animales. 7^{ma} edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana.
- Hayden, S.S., Blanchard, T.L., Brinsko, S.P., Varner, D.D., Hinrichs, K., y Love, C.C. (2012). Pregnancy rates in mares inseminated with 0.5 or 1 million sperm using hysteroscopic or transrectally guided deep-horn insemination techniques. *Theriogenology*, 78(4), 914-920.
- Henneke, D.R., Potter, G.D., Kreider, J.L., y Yeates, B.F. (1983). Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal*, 15(4), 371-372.
- Immonen, I., y Cuervo-Arango, J. (2020). Effect of timing post-ovulatory insemination relative to hCG/Buserelin treatment with 1 straw of frozen-

- thawed semen on mare fertility. *Journal of Equine Veterinary Science*, 87, 1-5.
- Klein, C. (2016). Maternal recognition of pregnancy in the context of equine embryo transfer. *Journal of Equine Veterinary Science*, 41, 22-28.
- Klein, C; y Troedsson, M.H.T. (2011). Maternal recognition of pregnancy in the horse: a mystery still to be solved. *Reproduction, Fertility and Development*. 23: 952-963.
- Kotilainen, T., Huhtinen, M., y Katila, T. (1994). Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*, 41(3), 629-636.
- Lazcano Montiel, S., y Pereyra Montans, F. (2020). Semen congelado en equinos: influencia del sitio y la dosis de inseminación sobre el transporte espermático y la respuesta inflamatoria. Tesis de grado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Veterinaria.
- Loomis P.R. (2006). Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, 22(3), 663–676.
- Loomis, P.R., y Squires, E.L. (2005). Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology*, 64(3), 480-491.
- Loomis, P.R. (2001). The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction Science*, 68(3-4), 191-200.

- Love, C. C., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Brinsko, S. P., Voge, J., Bliss, S., Sudderth, K., Teague, S., y LaCaze, K. (2012). Effect of daily semen centrifugation and resuspension on the longevity of equine sperm quality following cooled storage. *Theriogenology*, 77(9), 1911–1917.
- Lyle, S.K., y Ferrer, M.S. (2005). Low-dose insemination –why, when, and how. *Theriogenology*, 64(3), 572-579.
- Mari, G., Bucci, D., Love, C. C., Mislei, B., Rizzato, G., Giaretta, E., Merlo, B., y Spinaci, M. (2015). Effect of cushioned or single layer semen centrifugation before sex sorting on frozen stallion semen quality. *Theriogenology*, 83(6), 953–958.
- McCue, P; Magee, C; y Gee, E. (2007). Comparison of Compounded Deslorelin and hCG for Induction of Ovulation in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*. 27 (2), 58-61.
- McCue, P. (2014a). Palpation of the reproductive tract of the non-pregnant mare. En: Dascanio, J y McCue, P. *Equine Reproductive Procedures*. (pp. 22-25). Colorado, Estados Unidos. John Wiley & Sons, Inc.
- McCue, P. (2014b). Ultrasound evaluation of the non-pregnant mare. En: Dascanio, J y McCue, P. *Equine Reproductive Procedures*. (pp. 26-31). Colorado, Estados Unidos. John Wiley & Sons, Inc.
- McCue, P. (2014c). Prediction of Ovulation. En: Dascanio, J y McCue, P. *Equine Reproductive Procedures*. (pp. 32-34). Colorado, Estados Unidos. John Wiley & Sons, Inc.

- McCue, P. (2014d). Hysteroscopic (Low Dose) Insemination. En: Dascanio, J y McCue, P. *Equine Reproductive Procedures*. (pp. 133-135). Colorado, Estados Unidos. John Wiley & Sons, Inc.
- McCue, P. (2014e). Semen Freezing. En: Dascanio, J y McCue, P. *Equine Reproductive Procedures*. (pp. 436-440). Colorado, Estados Unidos. John Wiley & Sons, Inc.
- McCue, P; y Ferris, R. (2015). Hormone Therapy in Equine Reproduction. En: Sprayberry, K y Robinson, N. 7^{ma} edición, *Robinson's Current Therapy in Equine Medicine* (pp. 680-682). St. Louis, Missouri, Estados Unidos. Saunders Elsevier.
- Meira, C., Ferreira, J.C., Silva, E.S.M., y Ignacio, F.S. (2012). Developmental aspects of early pregnancy in mares. *Animal Reproduction*, 9(3), 166-172.
- Metcalf, E.S. (2007). The efficient use of equine cryopreserved semen. *Theriogenology* 68(3) 423-428.
- Metcalf, E.S., y Thompson, M. (2010). The Effect of PGF2 α - Induction of Estrus on Pregnancy Rates in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*. 30 (4), 196-199.
- Miller, C.D. (2008). Optimizing the use frozen-thawed equine semen. *Theriogenology*, 70(3), 463-468.
- Morrell, J.M., Rodriguez-Martinez, H., y Johannisson, A. (2010). Single layer centrifugation of stallion spermatozoa improves sperm quality compared with sperm washing. *Reproductive Biomedicine Online*, 21(3), 429-436.

- Morris, L.H., Hunter, R.H., y Allen, W.R. (2000). Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *Journal of Reproduction and Fertility* 118(1), 95-100.
- Olguín, R.O., y Esquivel, V.R. (2011). *Manual de inseminación artificial para la operatividad de semen congelado en yeguas (Equus caballus) del criadero militar de ganado Santa Gertrudis Chihuahua (tesis de pregrado)*. Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México.
- Oliveira, R.A., Rubin, M.I.B., y Silva, C.A.M. (2013). Índice de prenhez com semen congelado de garanhões de raça crioula usando glicerol ou dimetilformamida como crioprotetores. *Ciência Animal Brasileira*, 14(4), 488-494.
- Parkinson, T; y Morrel, J. (2019). Artificial Insemination. En: Noakes, D; Parkinson, T; & England, G. 10^{ma} edición. *Veterinary Reproduction and Obstetrics* (pp. 768-771). St. Louis, Missouri, Estados Unidos. Elsevier Health Sciences.
- Pillet, E., Batellier, F., Duchamp, G., Furstoss, V., Vern, Y. L., Kerboeuf, D., Vidament, M., y Magistrini, M. (2008). Freezing stallion semen in INRA96®-based extender improves fertility rates in comparison with INRA82. *Dairy Science & Technology* 88(2), 257-265.
- Pinto, C.R.F., y Meyers, P.J. (2007). Control and synchronization of the estrous cycle and ovulation. En: Youngquist, R y Threlfall, W. *Current therapy in Large Animal Theriogenology* (pp. 91-98). St. Louis, Missouri, Estados Unidos. Saunders Elsevier.

- Ramires Neto, C., Monteiro, G. A., Soares, R. F., Pedrazzi, C., Dell'aqua, J. A., Jr, Papa, F. O., Castro-Chaves, M. M., y Alvarenga, M. A. (2013). New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. *Theriogenology*, 79(7), 1120–1123.
- Real C. (1990). Zootecnia Equina. Primera Edición. México, D. F. Editorial Trillas S.A.
- Restrepo Betancur, G., Cortés, J.E.D., y Páez, J.D.M. (2012). Efecto de dos protocolos de criopreservación sobre la capacidad fecundante de semen equino (*Equus caballus*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 65(2), 6717-6724.
- Restrepo Betancur, G., Cantero-Nanclares, J.M., y Montoya-Paez, J.D. (2016). Efecto de la centrifugación sobre la integridad y la funcionalidad de espermatozoides equinos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(1), 119-125.
- Ribeiro, B., Ramos, R., Araujo, G.H., Fioratti, E. G., Trinca, L.A., Dell'Aqua, J.A., Jr, Melo E Oña, C.M., Zahn, F.S., Martin, I., Alvarenga, M.A., y Papa, F.O. (2015). Fixed – time insemination with frozen semen in mares: is it suitable for poorly fertile stallions?. *Theriogenology*, 83(9), 1389 – 1393.
- Samper, J.C. (2001). Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Animal Reproduction Science*, 68(3-4), 219-228.
- Samper, J; Estrada, A.J.; y McKinnon, A.O. (2007). Insemination with frozen semen. En: Samper, J; Pycocock, J & McKinnon, A. 1ra edición. Current Therapy in

Equine Reproduction (pp. 285-288). St. Louis, Missouri, Estados Unidos. Saunders Elsevier.

Samper, J. (2008). Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and others do not. *Theriogenology*. 70 (3); 445-447.

Sánchez, R., Gómez, I., y Samper, J. (2009). Artificial Insemination with Frozen Semen. En Samper, J; Equine Breeding Management and Artificial Insemination (pp. 175-183). St. Louis, Missouri, Estados Unidos. Saunders Elsevier.

Sielhorst, J., Hagen, C., Behrendt, D., Schuette, B., Burger, D., Martinsson, G., y Sieme, H. (2016). Effect of multiple freezing of stallion semen on sperm quality and fertility. *Journal of Equine Veterinary Science*, 40: 56-61.

Sieme, H., Schäfer, T., Stout, T.A.E., Klug, E., y Waberski, D. (2003). The effects of different insemination regimes on fertility in mares. *Theriogenology*, 60(6), 1153-1164.

Sieme, H., Knop, K., y Rath, D. (2006). Effects of cushioned centrifugation on sperm quality in stallion semen stored cooled at 5 degrees C for 24 h, and stored cooled for 2 or 24 h and then frozen. *Animal Reproduction Science*, 94(1-4), 99-103.

Sitters, S. (2014). Palpation of the pregnant mare per rectum. En: Dascanio, J y McCue, P. Equine Reproductive Procedures. (pp. 185-187). Colorado, Estados Unidos. John Wiley & Sons, Inc.

- Tazawa, S; Gastal, M; Silva, L; Evans, M; y Gastal, E. (2017). Preovulatory Follicle Dynamics, Ovulatory and Endometrial Responses to Different Doses of hCG, and Prediction of Ovulation in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*. 56; 40-51.
- Vidament, M., Dupere, A.M., Julienne, P., Evain, A., Noue, P., y Palmer, E. (1997). Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*, 48(6), 907-917.
- Yoon, M.J., Boime, I., Colgin, M., Niswender, K.D., King, S.S., Alvarenga, M.A., Jablonka-Shariff, A., Pearl, C.A., y Roser, J.F. (2007). The efficacy of a single chain recombinant equine luteinizing hormone (reLH) in mares: induction of ovulation, hormone profiles and inter-ovulatory intervals. *Domestic Animal Endocrinology*, 33(4), 470-479.