

Técnicas de detección de gonadotropina coriónica equina “eCG” como procesos
de diagnóstico de gestación en yeguas

Julián David Carreño Rincón
Yeimi Cotrina Jiménez
Lizeth Valentina Tarazona Marroquín

Tutor: Francisco Javier Vargas Ortiz, Médico Veterinario

Universidad Antonio Nariño.
Facultad de Medicina Veterinaria
Bogotá, D.C.
2020

Tabla de contenido

1 Índice

1	<i>Planteamiento del problema</i>	1
2	<i>Justificación</i>	4
3	<i>Objetivos</i>	6
4.	<i>Materiales y métodos</i>	7
4.1	Materiales	7
4.2	Metodología	7
4.2.1	Tipos de estudios	8
4.2.2	Tipos de medidas de resultados	8
4.2.3	Localización de estudios	8
4.2.4	Evaluación de la calidad de los estudios	9
5	<i>Marco teórico</i>	10
5.1	Ciclo estral de la yegua	10
5.2	Gestación de la yegua	13
5.3	Endocrinología de la gestación	14
5.3.1.1	Gonadotropina coriónica equina	14
5.3.1.2	Hormona Gonadotropina corionica equina sintetica	15
5.3.1.3	Progesterona	16

5.3.1.4	Estrógeno	16
5.3.1.5	Hormona folículo estimulante	17
5.3.1.6	Hormona luteinizante	17
5.3.1.7	Relaxina	17
5.4	Uso de eCG en otras especies	18
5.5	Métodos de detección de preñez	20
5.5.1	Ecografía:	20
5.5.2	Palpación:	20
5.5.3	Gonadotropina coriónica equina en sangre:	21
6	<i>Resultados</i>	22
6.1	Niveles eCG durante la gestación	22
6.2	Métodos de detección de gonadotropina coriónica equina en el plasma	23
6.2.1.1	Parámetros a tener en cuenta para la obtención del plasma equino con alta calidad requerida	23
6.2.1.2	Prueba ELISA:	24
6.2.1.3	Prueba de aglutinación en LÁTEX:	25
6.2.1.4	Prueba inmunoensayo cromatógrafo:	26
6.2.1.5	Métodos inmunológicos	26
7	<i>Discusión</i>	29
7.1	Nanotecnología para detección de eCG en sangre:	29
8	<i>Recomendaciones</i>	31
8	<i>Conclusiones</i>	31
9	<i>Lista de referencias</i>	33

Índice de figuras

Figura 1 Concentración hormonal en la circulación periférica de la yegua durante la gestación y parto (Tscherig, 2019).....	18
Figura 2 Niveles de eCG durante la gestación (Santillana, 2007)	22

Índice de tablas

Tabla 1 Metodos de detección de eCG	27
---	----

Resumen:

La gonadotropina coriónica equina (eCG) es una glicoproteína producida y secretada por la placenta de la yegua y cuya función es la de formar folículos secundarios destinados a transformarse en cuerpos lúteos accesorios ayudando a mantener la preñez. Esta hormona se puede utilizar como un indicador de preñez temprana en yeguas siendo una posible técnica diagnóstica de gestación que complementa las herramientas diagnósticas tradicionales (Palpación rectal y ecografía). El objetivo de el presente trabajo es hacer una revisión de literatura completa sobre la eCG en yeguas, identificar los procesos diagnósticos utilizados en la actualidad para la detección de la hormona para proponer nuevas técnicas de diagnóstico rápidas y precisas. Se efectuó una búsqueda sistémica y revisión de literatura por medio de buscadores académico y se utilizó Mendeley como gestor bibliográfico para facilitar el proceso de construcción de documento. Se concluye que la detección de eCG en sangre es un método complementario a las pruebas tradicionales que permite mejorar la precisión y detección más temprana de la preñez en yeguas. La prueba de ELISA es la técnica más usada pero requiere procedimientos de laboratorio y puede dar falsos negativos. Las técnicas de inmunocromatografía permiten elaborar dispositivos de diagnóstico rápido para la detención de eCG en muestras de sangre y orina.. El uso de la nanotecnología es una opción viable ya que permitiría el diseño de tintas con nanopartículas para tatuajes inteligentes permitirían una detección mucho más sencilla y rápida de la preñez en yeguas.

Palabras clave: equinos, gonadotropina coriónica equina, preñez, nanotecnología

Summary:

Equine chorionic gonadotropin (eCG) is a glycoprotein produced and secreted by the mare's placenta and whose function is to form secondary follicles destined to transform into accessory corpus luteum helping to maintain pregnancy. This hormone can be used as an indicator of early pregnancy in mares, being a possible pregnancy diagnostic technique that complements traditional diagnostic tools (rectal palpation and ultrasound). The objective of the present work is to make a complete literature review on eCG in mares, to identify the diagnostic processes currently used for the detection of the hormone to propose new rapid and accurate diagnostic techniques. A systemic search and literature review was performed through academic search engines and Mendeley was used as bibliographic manager to facilitate the document construction process. It is concluded that the detection of eCG in blood is a complementary method to traditional tests that allows to improve the precision and earlier detection of pregnancy in mares. The ELISA test is the most widely used technique, but it requires laboratory procedures and can give false negatives. Immunochromatography techniques allow rapid diagnostic devices to be developed to detect eCG in blood and urine samples. Nanotechnology is a viable option since it would allow the design of nanoparticle inks for smart tattoos that would allow much easier detection. and quick of the pregnancy in mares.

Key words: equines, equine chorionic gonadotropin, pregnancy, nanotechnology.

1 Planteamiento del problema

Las yeguas son animales poliestrictos y el fotoperiodo programa su actividad reproductiva (Vásquez et al., 2004) así que lo normal sería que tuvieran un parto por año por lo que es importante el uso de métodos que nos permitan diagnosticar la preñez en estas para controlar su salud durante la gestación y de esta forma optimizar el proceso reproductivo erradicando lo más que se pueda la presencia de abortos, uno de los factores que más afectan el rendimiento de este tipo de producción es la condición corporal (Gonzales, 2008), seguido por el aborto infeccioso ya que es una enfermedad grave en los criaderos de caballos (Velásquez y Albornoz, 1945), representando pérdidas en la inversión que se realiza desde la alimentación especial debido a que requieren mayores cantidades de minerales como calcio y fósforo (Alarcón, 2013) hasta gastos en el diagnóstico de gestación o intervenciones veterinarias más complejas que requieren de una mayor financiación de los propietarios ya que la intervención por parte del médico veterinario en casos en los que las yeguas no logren quedar preñadas o su desarrollo no sea el indicado requerirá de mayor supervisión y por ende de mayores costos ya que por ejemplo, mediante el uso de inseminación artificial quedan preñadas aproximadamente de 7 a 14 yeguas (Valdés, 2013) y de no ser así sería necesario el uso de otras alternativas que resultan más costosas como los tratamientos hormonales.

El mantenimiento de equinos representa una gran inversión por parte del dueño, aunque en los últimos 10 años el valor ha bajado aproximadamente un 80 % (hablando de caballo criollo colombiano) y su sostenimiento mensual ronda entre \$350.000 y \$450.000 incluyendo pesebrera y alimentación (Rojas, 2012), siendo más accesible la compra de una hembra que la de un macho, sin embargo, existen muchos factores que convergen para el éxito de los sistemas de producción equina, que se pueden traducir en ganancias o pérdidas graves para el propietario. (Vega, 2012).

Por lo anteriormente descrito, se propone el presente trabajo que es una revisión bibliográfica sistemática sobre la eCG y en especial sobre las técnicas de detección de esta hormona para el diagnóstico de preñez en yeguas, a fin de proponer nuevas técnicas que sean más precisas, confiables y económicas.

2 Justificación

Como parte del trabajo del médico Veterinario, se encuentra el seguimiento reproductivo de las hembras dentro de cada establecimiento, buena parte de este trabajo corresponde evaluar, sincronizar e inseminar. Existen diferentes métodos para determinación de preñez en yeguas dentro de los cuales tenemos la palpación rectal; uso de ultrasonido lo cual permite diagnosticar no solo la preñez, sino el estado y funcionalidad de útero y ovarios (Muñoz, 1995), del mismo modo, el uso sistemático de la ecografía una a dos veces por semana durante el período de montas mejora la fertilidad (Muñoz, 2006). También se ha utilizado la determinación de hormonas en sangre propias de la placenta en diferentes especies como metodología diagnóstica complementaria para la preñez. En el caso de la yegua la Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) es una hormona que se produce en la placenta de la misma entre los 40 y 150 días de gestación, presentando un pico entre los 50 a 80 días (Schroeder, 1993). Esta no solo tiene un rol fundamental en el mantenimiento de preñez temprana en la yegua (Villaraza, 2016) sino que también se utiliza en medicina veterinaria para controlar la actividad reproductiva en diferentes tipos de ganado, entre ellos el bovino, ovino, caprino y porcino (Rensis y López, 2014) utilizándose en la actualidad productos comerciales a base de preparaciones de (eCG) parcialmente purificada a partir de sangre de yeguas gestantes. (Villaraza, 2016)

Colombia tiene reconocimiento internacional por sus ejemplares equinos de exposición, deporte y trabajo cuyo inventario totaliza una población de 1.603.679 distribuidos principalmente en los departamentos de Antioquia (13,81%), Tolima (9,14 %), Córdoba (7,03%), Cundinamarca (6,91%), Casanare (6,05%), Cauca (5,57), Meta (4,99%), Caquetá (3.97%), Magdalena (3,95%) y Sucre (3.92%) es en estas regiones donde se concentra el 65,34% del censo equino Nacional. (Instituto Colombiano Agropecuario ICA, 2019) .

La detección de preñez por medio de la medición sérica de eCG en yeguas es un método importante ya que se presenta en las fases tempranas de la gestación (Santillana, 2007), permitiendo confirmar o descartar la preñez, lo que a la vez permite, llevar un buen seguimiento y control de la primera etapa de gestación, lo que reduce pérdidas económicas en caso de identificación temprana de abortos o montas no efectivas.

Por lo anteriormente expuesto, se requiere tener a disposición técnicas rápidas y altamente sensibles para realizar diagnóstico de preñez en forma temprana y precisa en yeguas, a fin de reducir las pérdidas económicas relacionadas con el manejo reproductivo de esta especie.

3 Objetivos

Objetivo general

- Recopilar información sobre técnicas de detección de la hormona gonadotropina coriónica equina (eCG) para diagnósticos de preñez en yeguas

Objetivo específico

- Identificar y analizar la importancia de la producción de la gonadotropina coriónica equina (eCG) en las yeguas preñadas y aprender su repercusión dentro del ciclo reproductivo de la yegua.
- Reconocer los niveles de gonadotropina coriónica equina (eCG) en los diferentes estados de preñez en las yeguas.
- Identificar los procesos diagnósticos utilizados en la actualidad para la detección de gonadotropina coriónica equina (eCG) en la gestación de las yeguas.
- Proponer el uso de nanotecnología para la detección en sangre de la eCG en yeguas preñadas.

4. Materiales y métodos

4.1 Materiales

- Artículos de Revistas científicas
- Revistas de divulgación.
- Libros de Medicina Veterinaria
- Bases de datos científicas
- Buscadores específicos en internet: Google scholar, etc.
- Estudios universitarios (monografías, tesis, etc.)

4.2 Metodología

Se efectuó una búsqueda sistémica y revisión de literatura por medio de buscadores académicos sobre el ciclo estral de la especie equina con el fin de entender la fisiología del mismo junto al proceso de la gestación y el papel de las diferentes hormonas que participan en estos haciendo especial énfasis en la gonadotropina coriónica equina (eCG), su producción, acción y efecto así como sus niveles de concentración en sangre a lo largo de la preñez de la yegua, se recopilaron por medio de la literatura las diferentes técnicas diagnósticas utilizadas para la detección de la eCG y su posible uso como método de detección de preñez en las yeguas junto con su papel en el proceso de la gestación de las mismas en Colombia y en diferentes partes del mundo con el fin de recopilar información al respecto durante el periodo comprendido desde 1990 hasta el 2020, luego se indagara con toda la información a la que se tuviera acceso a través de las bases de datos científicas, e internet con buscadores específicos teniendo en cuenta palabras claves que nos guiarán en

nuestra búsqueda como lo son: gestación, equinos, gonadotropina coriónica equina, métodos de determinación preñez, reproducción, hormonas, preñez, etc. También se hablará brevemente sobre los diferentes usos que posee esta hormona en la reproducción de otras especies domésticas como es el caso del bovino en el cual se usa esta hormona con el fin de mejorar la tasa reproductiva.

Se utilizó Mendeley como gestor bibliográfico para facilitar el proceso de construcción de documento ya que nos ayudará a organizar y organizar de forma correcta la bibliografía utilizada en el presente trabajo.

4.2.1 Tipos de estudios

Estudios observacionales descriptivos, casos y controles, estudios experimentales, monografías sobre preñez en yeguas y presencia de eCG, trabajos de investigación y experimentales (tesis), reportes de abortos o casos clínicos en yeguas preñadas.

4.2.2 Tipos de medidas de resultados

Reportes de presencia de eCG en yeguas preñadas, reportes de abortos en yeguas, reportes de detección de eCG, niveles y presencia de la hormona, funciones de eCG reportados por trabajos de investigación (trabajos de grado) o por búsquedas rutinarias en casos clínicos o bases de datos. Correlación de la detección de eCG frente a otras metodologías para el diagnóstico de preñez en yeguas

4.2.3 Localización de estudios

Revisión de trabajos de grado de las universidades nacionales e internacionales. Búsqueda manual y electrónica (Internet) de artículos en revistas, boletines médicos y memorias de congresos relevantes al tema. Consulta a expertos en el tema. Empleo de términos de búsqueda específicos como eCG, yeguas, diagnóstico, gestación, etc.

4.2.4 Evaluación de la calidad de los estudios

Se evaluará la calidad de los estudios con la intervención de varios observadores (Docentes, tutor y estudiantes que trabajan en el proyecto).

5 Marco teórico

5.1 Ciclo estral de la yegua

El ciclo estral se debe a la interacción de hormonas de la glándula pineal, hipotálamo, hipófisis, gónada y endometrio (Cortés et al., 2018). A diferencia de otros animales domésticos como la vaca, la especie equina posee una fase folicular altamente variable e inconsistente, presentándose la ovulación más próxima al final del estro que al inicio, dificultando así la predicción exacta del momento de la misma. (Andrade et al., 2011)

Para hablar del ciclo estral de la yegua lo primero que se debe mencionar es que son poliéstricas estacionales, es decir que son dependientes del fotoperiodo ya que necesitan de muchas horas de luz tal y como sucede en primavera y verano y de este modo tener partos en la temporada que favorezca a la supervivencia de su progenie. (Cortés et al., 2018)

El efecto del fotoperiodo es dependiente de la melatonina que es secretada por la glándula pineal durante las horas oscuras. (Diekman et al., 2002)

El estímulo necesario para la liberación de la melatonina es captado en la retina, la cual actúa como un fotoreceptor registrando así la presencia o falta de luz (Cortés, 2018) luego pasa al núcleo supraquiasmático del hipotálamo, al ganglio cervical posterior y la glándula pineal.

La ausencia de este estímulo promueve la síntesis de la N-acetil transferasa que influye sobre la serotonina para transformarla en N- acetil serotonina que es convertida en melatonina por la hidroxindolol-*o*-metil transferasa y esta actúa en el hipotálamo para regular la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) para así activar el eje hipotálamo-hipofisis-gónada causando la presencia de ciclos estrales en el animal. En épocas con menor cantidad de

luz donde hay mayor secreción de melatonina los folículos no alcanzan el crecimiento adecuado para llevar a cabo la selección folicular debido a la reducción de la hormona luteinizante por la retroalimentación negativa que genera la melatonina sobre el hipotálamo disminuyendo la secreción de GnRH causando atresia folicular y por consecuencia la no ovulación del animal (Collins et al., 2007). El periodo de transición de primavera se basa del anestro, período en el cual la secreción de melatonina es mayor evitando así la correcta maduración de los folículos a la ovulación donde hay crecimiento folicular y termina con la primer ovulación del año por efecto de la hormona LH gracias a la poca secreción de melatonina que permite al hipotálamo secretar GnRH mientras que el segundo periodo de transición en el otoño une la temporada de ovulación y el anestro que se caracteriza por reducción del crecimiento folicular y se da en el invierno ya que la luz durante este periodo es más escasa aumentando así la producción de melatonina. (Ginther et al., 2003), por lo tanto se establecen diferentes patrones de secreción a través del año; un periodo de menor duración de melatonina que comprende la época reproductiva y uno con mayor duración de melatonina que determina el anestro (Cortes et al., 2018) por esto la estacionalidad se incrementa en animales mantenidos en los hemisferios y se reduce conforme estén más cerca de la línea del ecuador. (Irvine y Alexander, 1994).

En las yeguas el ciclo estral se caracteriza por presentar ondas de crecimiento folicular ovárico con dos patrones típicos: una oleada menor en la cual el folículo más grande nunca tendrá el tamaño como para ser ovulatorio, y una oleada mayor en la que habrá folículos dominantes o preovulatorios y folículos subordinados. (Ginther et ál., 2008). La presentación de estas ondas tiene diferencias entre razas; algunas presentan sólo una onda folicular y otras razas, como la Pura Sangre Inglés (PSI), desarrollan una onda secundaria en el diestro temprano en la cual el folículo dominante puede ser ovulatorio o anovulatorio. (Ginther, 2003)

El ciclo estral se puede dividir en:

- **Fase folicular:** También conocida como el estro, tiene una duración de 4 a 7 días en la yegua, aunque es altamente variable debido a factores como edad, raza, o la presencia de folículos de menor diámetro (Paredes et al., 2012). En esta temporada ocurre la secreción hormonal que produce la ovulación, hay liberación de GnRH por parte del hipotálamo el cual estimula la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) por parte de la hipófisis anterior. El incremento en la concentración sérica de hormona luteinizante (LH) ocurre de forma lenta, alcanzando una concentración máxima después de 24 horas de la ovulación, esto produce el crecimiento, selección, maduración folicular produciendo estrógenos e inhibina las cuales hacen retroalimentación negativa; los estrógenos sobre las gonadotropinas y la inhibina sobre la FSH (Ginther et al., 2008) posteriormente, luego de la ovulación, se presenta una rápida disminución de las concentraciones plasmáticas de estrógeno e inhibina. El comportamiento de estro en la yegua es dependiente de la concentración de estrógenos en la sangre y puede ser observado por un promedio de 5 a 7 días; la duración depende de la yegua y del período estacional. Durante el estro la yegua presenta un comportamiento específico que se caracteriza por un incremento en la micción, receptividad al macho, levantamiento de la cola y eversión rítmica del clítoris, conocida como “guiño vulvar”; esta conducta se determina tradicionalmente por la exposición de la yegua al caballo para observar los signos de celo y la intensidad de éstos, los cuales pueden variar de una yegua a otra (Paredes, 2013). Posterior a la ovulación se forma un cuerpo lúteo el cual produce progesterona que también produce retroalimentación negativa sobre las gonadotropinas. En el hipotálamo se produce también la oxitocina que posteriormente será secretada por la hipófisis estimulando al endometrio a la producción de prostaglandinas F2 Alfa la cual

va a causar lisis del cuerpo lúteo y por consiguiente una disminución en la secreción de progesterona por parte del mismo. (Cortés et al.,2018)

- **Fase lútea:** La fase lútea o diestro se considera como el periodo restante del ciclo estral, esta fase dura alrededor de 14 a 15 días, variando de acuerdo con la duración del estro. Se inicia con la ovulación, la formación del cuerpo lúteo y posteriormente la secreción de progesterona que causa una retroalimentación negativa sobre el hipotálamo para inhibir la secreción de GnRH y de LH. Durante el diestro no hay receptividad hacia el macho y la progesterona (P4) produce cambios en el tracto reproductivo como son el incremento del tono uterino y el cierre del cérvix. (Paredes et al., 2012)

5.2 Gestación de la yegua

La gestación de la yegua dura aproximadamente de 315 a 345 días en los cuales hay cambios morfológicos, inmunológicos, y endocrinos en el oviducto y el útero importantes para el reconocimiento y el mantenimiento de la preñez. (Paredes, 2013)

El periodo de gestación se extiende desde la fertilización al parto y se divide en 3 periodos. El periodo ovular va desde la fecundación al día 15 durante el cual se desarrolla el blastocisto y llega al útero, el periodo embrionario va del 15 al 60 dando inicio a la organogénesis y finalmente el periodo fetal que va desde el día 60 hasta el parto. (Rivera, 2018)

Posterior a la ovulación en el lugar donde se encontraba el folículo dominante antes de liberar el ovocito se deposita un coágulo de sangre que se denomina como cuerpo hemorrágico, el cual posteriormente se empieza a llenar de células lúteas y así formar el cuerpo lúteo y se inicia con la producción de progesterona la cual es encargada de mantener la preñez alcanzando su pico de producción hormonal en el día 6 (Tscherig, 2019) y posteriormente descendiendo hasta el día 20

donde por acción de la eCG alcanzando su mayor concentración entre los días 40 y 70 que junto con la FSH de la hipófisis estimulan el desarrollo de cuerpos lúteos accesorios produciendo progesterona adicional (Ptaszynska, 2007), entre los días 36 y 38 se forman las copas endometriales las cuales desarrollan un papel primordial en el mantenimiento de la gestación hasta la que la placenta produce suficiente progesterona alrededor del día 100 para seguir manteniendo la preñez. (Rivera, 2018)

5.3 Endocrinología de la gestación

En la yegua gestante, como resultado de la persistencia del tejido lúteo, las concentraciones de progesterona permanecen elevadas, esto da lugar a una retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la hipófisis anterior, con una inhibición resultante del desarrollo folicular y la ovulación. Al mismo tiempo, el conceptus, luego de caer al útero, produce una “señal” que impide la producción de prostaglandinas. Este mecanismo se denomina “reconocimiento materno del embarazo”, en el cual la movilidad temprana de la vesícula embrionaria es importante para asegurar que todas las áreas del endometrio reciban la señal de su presencia, y así, que el cuerpo lúteo primario se mantenga (evitando la luteolisis) y continúe generando progesterona hasta la aparición de las copas endometriales al ser unas estructuras exclusivas de los équidos y proporcionan el área de adherencia del conceptus al útero, se originan durante los días 28 a 35 de gestación. (Tscherig, 2019)

5.3.1.1 Gonadotropina coriónica equina

La (eCG) es una glicoproteína estable a pH de 7,5 siendo producida y secretada por el tejido embrionario que forma nidos crateriformes en la pared uterina formando la cápsula endometrial

con un periodo máximo de concentración entre los 50 a 80 días, presenta un peso molecular de 61000 Daltons de los cuales un 45% es debido a su contenido de carbohidratos. Tiene acción sobre receptores FSH y LH y se cree que su función es la de estimular la formación de folículos secundarios destinados a transformarse en cuerpos lúteos accesorios con el fin de aumentar la secreción y por ende la concentración de progesterona para así ayudar a mantener la preñez.

Tiene dos subunidades designadas Alfa y Beta que son biológicamente inactivas por separado (López et al., 1999). Se produce exactamente en el corion de las yeguas preñadas y tiene un rol fundamental en el mantenimiento de la preñez en etapas tempranas (durante los primeros tres meses) , ya que estimula indirectamente la producción de P4 por el cuerpo lúteo (CL) hasta que la placenta puede secretarla por sí misma (Villaraza, 2016). La gestación se mantiene gracias a la producción de eCG por parte del endometrio sobre todo del día 40 al 70 de gestación(Orellana, 2015). Esta eCG junto con la hormona folículo estimulante (FSH) de la pituitaria estimulan la formación del CL accesorio que garantiza la producción de P4 hasta que el día 100 de gestación, la placenta puede mantener por sí sola la producción de P4 y la gestación. (Villaraza, 2016)

La gestación en la yegua dura aproximadamente 11 meses (315- 345 días), teniendo requerimientos altos de carbohidratos, lo que es determinante para que la eCG posea una vida media en circulación muy prolongada. (Paredes, 2013)

5.3.1.2 Hormona Gonadotropina corionica equina sintetica

En el estado de São Paulo se produjo la primera versión biotecnológica de la hormona eCG, creada para la utilización de inducción y sincronización de celos, con esta se busca que tenga la misma acción a la natural y se evitaría el uso de yeguas preñadas para la producción de dicha hormona, así reduciría los abortos recurrentes y las muertes prematuras en las yeguas y es de un costo de 30%-50% más bajo (Andrade, 2017). Esta hormona ya se ha probado en varias especies

como los bovinos, porcinos y ovinos, con el objetivo de optimizar los resultados de la inseminación artificial (IA). (Velásquez, 2011)

5.3.1.3 Progesterona

Es el primer progestágeno, producido por el cuerpo lúteo. Las concentraciones plasmáticas de progesterona se elevan de 7 a 8 ng/ml a los 6 días. Se mantienen a este nivel durante las 4 primeras semanas de gestación y llega a un pico de 10 - 15 ng/ml alrededor del día 25 ocurriendo a veces un descenso transitorio alrededor del día 28 postovulación (5 ng/ml) y se vuelven a elevar a continuación hasta un nuevo pico a los 80-90 días de gestación debido a la formación de los cuerpos lúteos accesorios por acción de la FSH sobre los folículos y la influencia de la eCG (Agrados et al., Equisan). Debido a la presencia de CL secundarios, las concentraciones de progestágeno en la circulación periférica aumentan, para alcanzar y mantener una meseta desde aproximadamente el día 50 a 140, y luego disminuir entre los 180 y los 200 días de gestación (con concentraciones por debajo de 1 ng/ml) y permanecer así hasta aproximadamente los 300 días de gestación. (Tschurig, 2019)

5.3.1.4 Estrógeno

El estrógeno en la yegua preñada puede ser producido por el conceptous, el ovario y la unidad feto-placentaria. Las concentraciones de estrógenos totales en la circulación periférica durante los primeros 35 días de gestación son similares a las del diestro. Si bien existe una producción temporal de estrógeno por parte del embrión entre los 12 a 20 días, dichos estrógenos se producen localmente y no aumentan las concentraciones circulantes. Después de este tiempo,

aumentan para alcanzar una meseta entre los días 40 y 60, a valores que se encuentran ligeramente por encima de los existentes antes de la ovulación (aproximadamente 3 ng/ml), que probablemente se debe al aumento del desarrollo folicular asociado con la producción de eCG. Después del día 60 es probable que el aumento se deba a la actividad del feto o la placenta y la presencia de folículos accesorios (Peña, 2019). La concentración máxima se da en el día 210 y posteriormente ocurre un descenso lento hasta el parto y un descenso rápido posparto. (Agrados et al., Equisan)

5.3.1.5 Hormona folículo estimulante

La FSH se libera de forma eventual hasta los 40 días de gestación (y probablemente también hasta aproximadamente los 100 días). Antes de los 40 días, es responsable del desarrollo folicular y, posteriormente, es probable que sea sinérgica con la eCG y cause una actividad ovárica marcada. (Tscherig, 2019)

5.3.1.6 Hormona luteinizante

Las concentraciones de LH son bajas durante la gestación.

5.3.1.7 Relaxina

Hormona de la gestación producida en la unidad placentario-uterina. Comienza hacia el día 75 de la gestación, alcanza un pico hacia el día 180 y desciende hasta el 8° mes, momento en el que aumenta de nuevo hasta el parto. Se cree que actúa con la prolactina en el mantenimiento de la preñez e impidiendo contracciones uterinas espontáneas. (Agrados et al., Equisan)

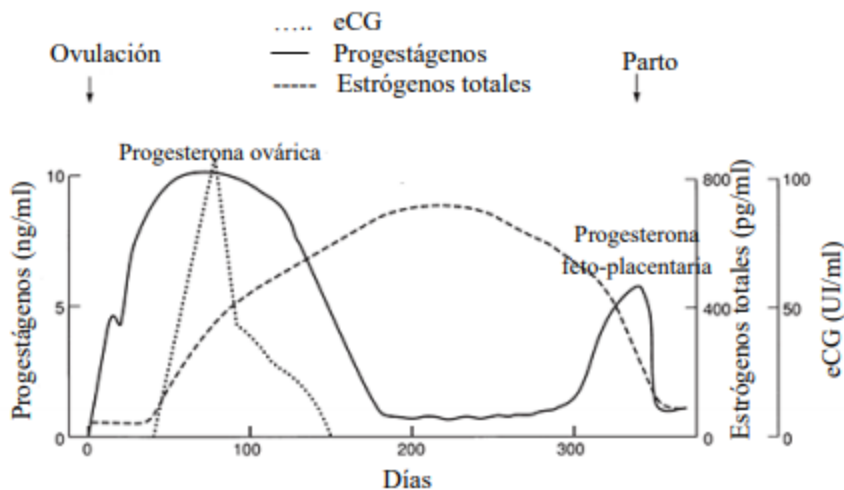


Figura 1 Concentración hormonal en la circulación periférica de la yegua durante la gestación y parto (Tscherig, 2019)

5.4 Uso de eCG en otras especies

La eCG posee actividad FSH y LH cuando es administrada en especies diferentes al equino en donde solo posee actividad LH, justificándose su uso en situaciones donde se requiera la terapia con gonadotropinas exógenas, particularmente cuando es necesario un estímulo de la foliculogénesis en ovarios con actividad reducida o nula. (Sintex, 2005)

La utilización de eCG en protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) está siendo cada vez más usada por la ventaja que presenta en ciertas características de animales al aumentar el porcentaje de preñez como en vacas de carne con cría al pie, baja condición corporal, vacas lecheras lactantes y anestro. Sin embargo cuando se a usado ha sido en vacas con buena condición corporal los porcentajes de preñez no se incrementan con respecto a los grupos que no recibieron eCG. (Sagbay, 2012)

Así lo demuestra un estudio realizado en el 2012 , donde la eCG era aplicada en un protocolo con dispositivo intravaginal de progesterona y permitió detectar la ovulación en hembras

durante los primeros 10 días de culminados los tratamientos. El 78.9% de las vacas tratadas con eCG ovularon frente al 29% de vacas que ovularon del grupo control sin eCG. (Garnica, 2012)

Según reportes de Garnica (2012), la adición de eCG en protocolos de sincronización en búfalos con baja expresión de estró mejora sustancialmente la tasa de ovulación. Cuando este tratamiento es seguido por IA a tiempo fijo, las tasas de embarazo logrados en búfalos en anestro, ya sea cíclico y no cíclico, puede acercarse a las tasas observadas en vacas inseminadas a estró natural.

Adicionalmente, la eCG ha sido utilizada para inducir la ovulación y aumentar las tasas de preñez en protocolos de inseminación artificial en ovejas (Luther et al., 2007). Sin embargo en cabras se ha observado que el uso repetido de eCG para la inducción de la ovulación podría causar un descenso en la fertilidad debido a la generación de anticuerpos anti-eCG. (Roy et al., 1999)

La eCG al ser capaz de unirse a receptores FSH y LH podría estimular indirectamente la espermatogénesis y aumentar la concentración sérica de testosterona, como lo reporta un estudio en el 2013, donde un venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) azoospermico (ausencia de espermatozoides) se le administró 500 UI de eCG la terapia logró restaurar la actividad testicular y reiniciar la espermatogénesis (Ungerfeld, 2013). También se ha demostrado en carneros que la eCG en estación no reproductiva aumenta los niveles de testosterona y la capacidad de estimular la actividad reproductiva en hembras. (Ungerfeld et al., 2014)

La administración de 250 UI de eCG con un intervalo de dos semanas entre cada una en perros con asternozoopernia produjo una mejoría transitoria en la espermatogénesis. (Kawakami et al., 1999)

5.5 Métodos de detección de preñez

5.5.1 Ecografía:

La ecografía es una técnica de imagen basada en la utilización de ultrasonido (US) el cual se define como aquel sonido que tiene una frecuencia mayor a la que escucha el ser humano. (González, 2018)

Los principales usos de este método son para determinar el sexo, para saber en qué momento de la ovulación se encuentra, si hay algún hallazgo patológico. Sus aplicaciones más utilizadas intervienen en los controles de ovulación y desarrollo folicular, sirve para estudiar los ovarios, si se presenta alguna alteración, determina también si hay presencia de gestación gemelar, evita futuros abortos, presencia de quistes endometriales, etc.. (Bellenda, 2005)

El uso de la ecografía en la detección de la preñez en yeguas a los 10 a 14 días después de la ovulación orienta al estudio de la incidencia de pérdida embrionaria entre los 14 y 40 días. En un estudio realizado por Rivera en el 2012, (Rivera, 2012) demostró que mediante ecografía que las tasas de preñez reducen y las tasas de pérdida embrionaria incrementan con la edad de las yeguas.

5.5.2 Palpación:

Es el método más sencillo y económico, para esta práctica no se necesitan aparatos tecnológicos, este procedimiento se debe realizar con guantes, lubricación y vestimenta apropiada. (Rangel et al., 2009)

La palpación rectal puede causar algunos traumas ya que la yegua es más susceptible a rupturas y peritonitis a comparación de la vaca sea por palpación muy demorada, por traer uñas largas, anillos, también puede haber aborto por falta de lubricación al momento de palpar ya que causaría traumas en la mucosa intestinal al intentar ingresar forzosamente el brazo en el animal,

sin embargo es una práctica que se hace muy seguido en las yeguas para diagnosticar preñez ya que este es muy certero. (Rivera, 2012).

5.5.3 Gonadotropina coriónica equina en sangre:

Otro método de detección de preñez es el uso de la eCG, esta puede ser detectada en orina, leche y suero a partir de los 35 a 38 días después de la concepción. Los niveles circulantes de esta hormona crecen muy rápido en el primer mes, hasta alcanzar su pico en un rango de 6 a 8 semanas de preñez. La aparición de la gonadotropina en suero y orina después de la concepción junto con su rápido aumento de concentración durante los principios de la gestación la hacen un excelente indicador para la detección temprana de la preñez equina. (Santillana, 2007)

6 Resultados

6.1 Niveles eCG durante la gestación

Ya que la hormona tienen como función ayudar a mantener la preñez temprana presenta diferentes concentraciones a lo largo de la gestación al aumentar el crecimiento folicular y aumentar los niveles de progesterona. (Garnica, 2012)

La eCG aparece en sangre entre los 38 a 42 días post-ovulación y es producida por las copas endometriales alcanzando un valor máximo a los 60- 65 días de gestación (20 - 300 UI/mL) con el fin de estimular folículos secundarios que posteriormente se transformaran en cuerpos lúteos accesorios. Generalmente se encuentra en sangre hasta el cuarto mes de gestación y presentará una caída brusca casi indetectable entre los días 120 -150. (Tscherig, 2019)

En experimentos que se han realizado en yeguas de varias razas se presenta diferencias marcadas de la hormona ECG, tanto en el pico alcanzado como en la duración de actividad de esta hormona en la sangre, los perfiles de la hormona alcanzan picos más altos y muestran mayor variación en las hembras de raza pequeñas como los ponys comparándose con las de mayor tamaño como Thoroughbreds, esto quiere decir que la concentración de dicha hormona dependerá de la raza de la hembra y del volumen total del tejido endometrial que se desarrolla en el útero. (Ferreira et al., 2005)

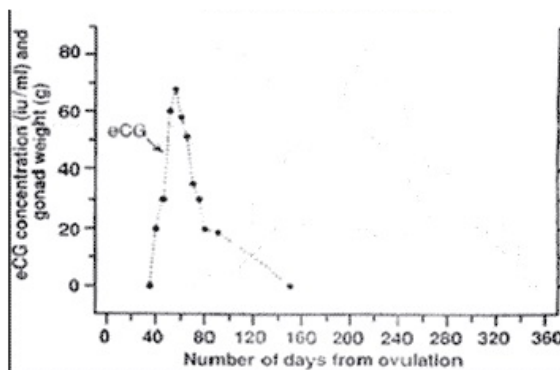


Figura 2 Niveles de eCG durante la gestación (Santillana, 2007)

6.2 Métodos de detección de gonadotropina coriónica equina en el plasma

Son métodos sensibles, rápidos y confiables para detectar la presencia de esta hormona, garantiza la colecta de plasma con altas concentraciones de la hormona. Tradicionalmente los medios de diagnóstico, la colecta del plasma se realizaba por control de monta de los animales que se traducían en que un gran porcentaje es de los mismos que al ser testados antes de su uso en la producción resultaban negativos. El empleo de técnicas como ELISA y la prueba de aglutinación en LÁTEX ha reducido considerablemente el porcentaje de plasma negativo y la calidad de plasma que llega a la producción es superior. (Labiofam, 1999)

6.2.1.1 Parámetros a tener en cuenta para la obtención del plasma equino con alta calidad requerida

- Selección de las unidades equinas: Los animales deben contar con un certificado médico que avale el estado epizootico de los animales libres de enfermedades infectocontagiosas, las hembras deben tener entre 3 y 10 años, con buen estado físico y de salud y estar entre los 40 y 120 días de gestación. (Hernández et al., 1999)
- Muestreo: Se debe tomar una muestra entre los 5 y 8 ml de sangre de yeguas gestantes, se hace un test diagnóstico para seleccionar los animales positivos para realizar sangría. (Silva, 2005)
- Sangría: El volumen de sangre a obtener dependerá del estado de salud del donante, es así como un caballo sano de 500 kg puede donar de 6 a 8 litros. Durante la extracción es necesario mover el recipiente para evitar la coagulación y cerciorarse además de que la sangre corra por las paredes del recipiente para evitar hemólisis. Al terminar la sangría se toman todas las medidas higiénicas sanitarias para proteger al donante. A

cada donante se le realizan de tres a cinco sangrías con intervalos de 15 días, teniendo en cuenta los resultados del primer muestreo solamente. (Silva, 2005)

- Decantación : La sangre colectada es conservada en refrigeración entre 2 a 8°C durante 48 a 72 horas para que sedimenten los hematíes, obteniendo un rendimiento entre 50 y 60 % de plasma. Se realiza en un área aséptica. Se decanta el plasma en tanques por 20 0 25 litros identificando el mismo, según la brigada. (Labiofam, 1999)
- Almacenamiento y recepción para la producción industrial: El plasma es almacenado en refrigeración a 20°C, posteriormente es trasladado en un transporte refrigerado para ser utilizado en la producción y es recibido acompañado de un protocolo que incluye la fecha, lugar, hora de sangría, donantes y otros datos del control de la sangría. A cada tanque se le realiza una titulación mediante el test de ELISA como contrapartida del test de Látex realizado a los donantes directamente. (Agrocalidad, 2018)

6.2.1.2 Prueba ELISA:

Es un método inmunoenzimático muy difundido y de los más utilizados para detectar macromoléculas y requieren de la separación en fases mediante un inmuno absorbente de fase sólida empleándose el análisis competitivo mediante conjugado de enzima – anticuerpo: consiste en la inmovilización del antígeno, o el anticuerpo sobre una fase sólida añadiéndose posteriormente de forma secuencial los otros componentes de la reacción. Entre cada paso se realizan lavados para eliminar lo que no se fijó. El fundamento de esta técnica se basa en la reacción antígeno anticuerpo y se revela con la adición del sustrato específico de la enzima. Tradicionalmente y antes de los medios de diagnóstico se realiza una colecta de plasma por control de monta de los animales lo que se traducía en un porcentaje de animales que al ser testeados antes de su uso en la producción resultaban negativos, esto es importante ya que el

detectar la presencia de la hormona en el plasma no garantiza que al que haya grandes concentraciones en la colecta. (López et al., 1999)

Algunos factores importantes del método descritos por el autor Labiofam en 1999 son:

- La fase sólida que es un inmunoabsorbente donde se inmoviliza el antígeno o el anticuerpo en una cantidad que pueda ser producible. En la actualidad se emplean placas de polivinilo.
- Los antisueros se producen principalmente en conejos y su purificación, así como el esquema de inmunización depende del tipo de antígeno empleado. Se toma el suero cuando la producción de IgG es elevada y se realiza una reabsorción del suero para evitar reacciones no específicas cuando sea necesario
- El conjugado es uno de los factores más importantes del método ELISA. La enzima que forma el conjugado debe mantener su actividad y el anticuerpo sus capacidades inmunológicas. La enzima debe ser altamente reactiva, estable, pura, económica y con gran actividad específica.
- El sustrato debe permitir la detección de la enzima que está formando el conjugado, debe ser específico y reproducible, ser fácil de preparar, poco nocivo, los productos de la hidrólisis deben ser solubles y con un coeficiente de extinción alto. El tiempo de reacción enzima-sustrato se determina experimentalmente.
- Los lavados se realizan después de los periodos de incubación para eliminar lo no fijado y lo que está en exceso. Para ello se emplea agua destilada, solución salina o BPS.

6.2.1.3 Prueba de aglutinación en LÁTEX:

Es un método para examinar anticuerpos o antígenos conocidos que se unen a partículas de látex con el objeto de facilitar la visualización de la prueba. Las partículas de látex se unen

fácilmente a la porción fragmento de región cristalizable (Fc) de moléculas de inmunoglobulinas G y M , los fragmentos de unión del anticuerpo se unen al antígeno de la muestra y si estos antígenos tienen varios epítopes los anticuerpos multivalentes acoplados a múltiples moléculas de látex se unen al antígeno dando como resultado una aglutinación visible. Esta prueba es de uso fácil y rápido además de presentar un alto grado de sensibilidad y especificidad. (Sotelo, 2010)

6.2.1.4 Prueba inmunoensayo cromatógrafo:

Esta prueba es cualitativa para la detección de esta hormona en suero. La prueba utiliza una combinación de antibióticos incluyendo anticuerpos monoclonales y policlonales, para detectar los niveles de sensibilidad asegurada de la hormona, la prueba no muestra reacción cruzadas con las hormonas FSH, LH, TSH, a niveles fisiológicos altos. El ensayo debe estar a temperatura ambiente, este es dirigido aplicando dos gotas de suero en la placa de diagnóstico, donde migra por acción capilar a través de la membrana para reaccionar con el conjugado coloreado. Los resultados positivos reaccionan con el conjugado de anticuerpos de la hormona formando una línea coloreada en la marca que le corresponde, si la formación de la línea está ausente indica resultados negativos. (Santillana, 2007).

6.2.1.5 Métodos inmunológicos

En la actualidad la utilización de estos métodos para la detección de eCG son ampliamente utilizados y difundidos principalmente en el campo de investigación y no como un método diagnóstico de preñez, estos se basan en una reacción antígeno-anticuerpo como es el caso del test PMSG ELISA. El anticuerpo es producido por hiperinmunización de otros animales como el conejo en los cuales se evalúa por medio de un ELISA el título de anticuerpos desarrollados una vez utilizado el plan de inmunización (Villarraza, 2016) utilizando la eCG como antígeno, este anticuerpo específico para la eCG se

adhiera a un micro platillo (fase sólida) si hay presencia de eCG en el suero de la yegua este también se va adherir al platillo, a esto se ha sumado una reacción enzimática que produce una coloración con el fin de cuantificar la eCG. (Ferreira et al., 2005)

Tabla 1 Métodos de detección de eCG

Autor	Método	Descripción	Referencia
Labiofam	Detección en plasma	Yeguas certificadamente sanas, con edad promedio de 3-10 años, y debe estar entre los 40-120 días de gestación, para proseguir con el procedimiento que consta de: muestreo, sangría, decantación, almacenamiento, recepción para la producción industrial.	Labiofam (1999). http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/4917/2/anexo%20.%20presentaci%c3%b3n%20pueba%20de%20elisa.pdf
Labiofam	ELISA	Detecta macromoléculas, consiste en inmovilización del antígeno o el anticuerpo para ver su reacción y se revela adicionando un sustrato específico. Este comprende unas fases que son: fase sólida, antisueros, conjugado, sustrato y por último lavados.	Labiofam (1999). http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/4917/2/anexo%20.%20presentaci%c3%b3n%20pueba%20de%20elisa.pdf
Sotelo	Aglutinación en látex	Examina anticuerpos o antígenos conocidos que se unen al látex facilitando su visualización.	Sotelo (2010). https://es.scribd.com/document/43927196/AGLUTINACION

Santillana	Inmunoensayo cromatógrafo	Utiliza antibióticos incluyendo anticuerpos mono y policlonales para detectar los niveles de sensibilidad de la hormona	Santillana (2007). https://www.engormix.com/equinos/articulos/prueba-diagnostica-prenez-equina-t26844.htm
Villaraza	Métodos inmunológicos (test PMSG ELISA)	El anticuerpo es producido por hiperinmunización de otros animales (conejos), en los cuales se evalúa por medio de un ELISA.	Villaraza (2016). https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/1569/2.3.13.pdf
Ferreira	ELISA	Utilizando la eCG como antígeno, el anticuerpo específico para eCG se adhiere a un micro platillo y produce coloración con el fin de cuantificar la eCG.	Ferreira (2005). https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/19308/1/FV-26507.pdf

7 Discusión

En nuestro caso ya que lo que buscamos es la detección de esta hormona en sangre como un método de preñez se puede resaltar el uso de diferentes métodos más accesibles económicamente para los propietarios y que se encuentran disponibles para la práctica de la medicina veterinaria ya mencionados anteriormente tales como la prueba ELISA comercial, sandwich ELISA, aglutinación en LATEX e inmunoensayo cromatógrafo los cuales son basados principalmente en la detección de anticuerpos siendo en realidad unos muy buenos indicativos de la hormona en sangre. Resaltando principalmente el ELISA ya que es el método más sencillo y accesible desde nuestro punto de vista ya que en la actualidad ya se encuentran disponibles KITS en el mercado extranjero, sin embargo Gupta et al. 2016 realizó un estudio con el fin de demostrar la especificidad y la sensibilidad del ELISA sandwich frente al kit comercial realizado pruebas en 175 yeguas con servicio confirmado arrojando resultados positivos para 75 yeguas evaluadas que posteriormente fueron evaluadas dando resultados indicando una especificidad del 99.00% y una sensibilidad del 100%. No hace falta mencionar que en la cotidianidad hay métodos mucho más sencillos para la detección de la preñez en las yeguas y que dan muy buenos resultados tales como la ecografía el cual es un método muy difundido y utilizado en la clínica equina y en el manejo de la reproducción.

7.1 Nanotecnología para detección de eCG en sangre:

Según la revisión de literatura realizada se puede pensar que hoy en día el uso de diferentes tecnologías se ha empleado para la medición de diferentes hormonas no solo en el campo de la medicina humana sino también en la medicina veterinaria con fines productivos, unos de los más novedosos es el uso nanotecnología que comprende la representación gráfica, la medición, el

modelado y la manipulación de la materia en una escala nanométrica regulando las acciones de las moléculas mensajeras con las hormonas y los mediadores manteniendo la estabilidad iónica y fabricando una gran variedad de bloques de construcción para el organismo. (Robles, 2010)

Este método no invasivo de la biomedicina es usado en enfermedades como la diabetes y se basa en la detección de tres moléculas principales por medio de sensores de glucosa basados en nanopartículas para su medición en sangre (Urrejola, 2018), estos biosensores se ubican en la epidermis del paciente y por medio de controles se revisa los niveles de la hormona circulante.

Los Biosensores a nanoescala o nanobiosensores representan un paso fundamental para el desarrollo de nuevos dispositivos destinados a medir los niveles de azúcar en la sangre, estos proporcionan un aumento en la sensibilidad en los límites de cuantificación, los cuales son requeridos para un mejoramiento en el análisis. El uso de nanomateriales funcionalizados con biocomponentes puede mejorar drásticamente la estabilidad y la especificidad de la detección en el sistema, mejorando así su reproducibilidad y fiabilidad (Muñoz, 2012). Esta tecnología se puede implementar para el diagnóstico de preñez en yeguas ya que los tatuajes son realizados con tintas que fluorescen visiblemente bajo luz ultravioleta (Graphic, 2010), sin embargo, sus elevados costos son un inconveniente para la aplicabilidad de esta prueba en el campo de la medicina veterinaria.

8 Conclusiones

- La evaluación clínica junto con la palpación rectal y ecografía siguen siendo los métodos más sencillos y económicos para detección de preñez en yeguas.
- La detección de eCG en sangre es un método complementario a las pruebas tradicionales que permite mejorar la precisión y detección más temprana de la preñez en yeguas ya que sus niveles de concentración están presentes en la primera etapa de la gestación.
- La prueba de ELISA es la técnica más usada pero requiere procedimientos de laboratorio y puede dar falsos negativos.
- Las técnicas de inmunocromatografía permiten elaborar dispositivos de diagnóstico rápido para la detección de eCG en muestras de sangre y orina. Estas técnicas se pueden mejorar para hacerlas más precisas.
- El uso de la nanotecnología es una opción viable ya que permitiría el diseño de tintas con nanopartículas para tatuajes inteligentes como se han usado en humanos para detectar sustancias como glucosa o insulina. Estos tatuajes permitirían una detección mucho más sencilla y rápida de la preñez en yeguas.

Recomendaciones

- En la práctica clínica de la reproducción equina no es común realizar un seguimiento adecuado a lo largo de la gestación de la yegua por lo que resaltamos la importancia de esta práctica ya sea mediante ecografía o medición de hormonas ya que no solo es importante la confirmación de preñez si no que además se debe monitorear tanto por la salud y el bienestar de la yegua y del potro que esta se encuentra gestando y de esta forma poder detectar problemas durante la gestación o anomalías en la misma que de ser

detectadas a tiempo y pueden ser tratadas y monitorizadas con el fin de optimizar la producción en estos animales.

- También consideramos importante ampliar el uso y mejoramiento de técnicas como la inmunocromatografía ya que son pruebas no invasivas con las ventajas de simplicidad y rapidez, permitiendo confirmar o descartar la preñez de las yeguas, considerándose económico en comparación con otros métodos tradicionales de diagnóstico de preñez.

9 Lista de referencias bibliográficas

- Agrocalidad. (2008). Toma y envío de muestras en animales domésticos. Recuperado de: <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2018/02/11-INT-DA-19-Rev-4.pdf>
- Agrados, P. y Vázquez, A. Equisan. La clínica equina en la web. Recuperado de: <http://www.equisan.com/images/pdf/diagesta.pdf>
- Alarcón, G. (2013). 303020 sistemas de producción equina. Recuperado de: https://www.academia.edu/22789963/UNIVERSIDAD_NACIONAL_ABIERTA_Y_A_DISTANCIA_UNAD_UNIVERSIDAD_NACIONAL_ABIERTA_Y_A_DISTANCIA_ESCUELA_DE_CIENCIAS_AGRICOLAS_PECUARIAS_Y_DEL_MEDIO_AMBIENTE_303020_SISTEMAS_DE_PRODUCCION_EQUINA
- Andrade, C. (2017). Una hormona biotecnológica reduce los costos para inducir la ovulación en el ganado. Recuperado de: <http://agencia.fapesp.br/una-hormona-biotecnologica-reduce-los-costos-para-inducir-la-ovulacion-en-el-ganado/26083/>
- Andrade, F. Pérez, J. Oliveira, A. Do Vale, V. Marc, H. Chacón, L. y Arias, S. (2011). Foliculogénesis y ovulación en la especie equina. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n22/n22a05.pdf>
- Bellanda, O. (2005). El ultrasonido o ecografía aplicados en la reproducción animal. Recuperado de: http://www.ecografiavet.com/pdf/Ecografia_en_Vacas_y_Yeguas.pdf
- Borrego, R. González, R. (2018). Fundamentos básicos de ecografía. Recuperado de: <https://secip.com/wp-content/uploads/2018/09/1-FUNDAMENTOS-BASICOS-DE-ECOGRAF%C3%8DA.pdf>
- Collins, S. Zieba, D. Williams, G. (2007). Administración continua de dosis bajas de GnRH en yeguas II respuestas hipofisarias y ováricas al tratamiento ininterrumpido

comenzando cerca del equinoccio y continuando durante la época anovulatoria.

Recuperado de:

https://www.researchgate.net/publication/6247905_Continuous_administration_of_low-dose_GnRH_in_mares_II_Pituitary_and_ovarian_responses_to_uninterrupted_treatment_beginning_near_the_autumnal_equinox_and_continuing_throughout_the_anovulatory_season

- Cortes, Z. Florez, C. Delgado, M. Berimen, F. Marco, C. y Flores G. (2018). Revisión: El ciclo reproductivo de la yegua. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-61322018000300014&lng=es&nrm=iso&tlng=es#B22
- Diekman, M. Braun, W. Peter, D. y Cook, D. (2002). Seasonal serum concentrations of melatonin in cycling and nocycling mares. Recuperado de: <https://pdfs.semanticscholar.org/df57/6e68f4af86124bde0357c1d6bfc01cc91b44.pdf>
- Ferreira, J. Freire, H. y Kalpokas, I. (2005). Determinación de los niveles plasmáticos de eCG en yeguas a partir del aborto inducido al día 70 de gestación. Recuperado de: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/19308/1/FV-26507.pdf>
- Graphic, E. (2010). ¿Qué es un nanotatuaje y por qué te gustaría tener uno?. Recuperado de: https://www.nci.net/sites/default/files/inline-files/nanooze_edition_08_sp-1afe06f_1.pdf

- Garnica, P. (2012). “Efecto de la gonadotropina corionica equina (eCG) en la ovulacion con protocolos de IATF en vacas holstein posparto”. Recuperado de: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/406/1/TESIS.pdf>
- Ginther, O. Beg, M. Donadeu, F. Bergfelt, D. (2003). Mecanismo de desviación folicular en especies de granja monovular. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818647>
- Ginther, O. Beg, M. Neves, A. Mattos, R. Petricci, B. Gastal, M. (2008). Miniature ponies: Endocrinology of the oestrous cycle. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/5449465_Minature_ponies_2_Endocrinology_of_the_oestrous_cycle
- González, M. (2008). La salud y el cuidado del caballo, hospital veterinario sierra de madrid: la yegua y el potro. Recuperado de: <http://www.hvsmveterinario.com/casosclin/1311%20la%20yegua%20y%20el%20potro.pdf>
- Gupta, A. Kumar, S. Pal, Y. (2016). Development of equine chorionic gonadotrophin (eCG) based sandwich ELISA for pregnancy diagnosis and fetus viability in mares. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Ashok_Gupta11/publication/301629733_Development_of_equine_chorionic_gonadotrophin_ECG_based_sandwich_ELISA_for_pregnancy_diagnosis_and_fetus_viability_in_mares/links/57244cf508aee491cb3783ba/Development-of-equine-chorionic-gonadotrophin-ECG-based-sandwich-ELISA-for-pregnancy-diagnosis-and-fetus-viability-in-mares.pdf?origin=publication_detail

- Hernandez, J. Lenguen, O. Capote, A. Perez, J. Bello, M. (1999). Organización de la campaña nacional para la obtención, control calidad y conservación de plasma de yeguas gestantes para la producción de PMSG/PMSG en la República de Cuba. Recuperado de: <https://www.g77.org/pgtf/finalrpt/INT-95-K01-FinalReport.pdf>
- Higuera, M. Escobar, C. Hernández, A. (2012). Progesterona plasmática y algunas características uterinas y embrionarias en la gestación temprana en yeguas criollas colombianas. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n24/n24a12.pdf>
- Instituto agropecuario colombiano ICA. (2019). Censo pecuario año 2019. Recuperado de: <https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/epidemiologia-veterinaria/censos-2016/censo-2018>
- Irvine, C. y Alexander, S. (1994). La dinámica de la secreción de hormona liberadora de gonadotropina, LH y secreción de FSH durante la oleada ovulatoria espontánea de la yegua, según lo revela el muestreo intensivo de sangre venosa pituitaria. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8169561>
- Kawakami, E. Hori, T. Tsutsui, T. (1999). Cambios en la calidad del semen y la capacitación in vitro de los espermatozoides durante varias frecuencias de recolección de semen en perros con astenozoospermia y teratozoospermia. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/13647927_Changes_in_Semen_Quality_and_In_Vitro_Sperm_Capacitation_during_Various_Frequencies_of_Semen_Collection_in_Dogs_with_Both_Asthenozoospermia_and_Teratozoospermia
- Labiofam. (1999). Optimización del proceso de obtención de la hormona PMSG cruda para la producción animal. Recuperado de: <https://www.g77.org/pgtf/finalrpt/INT-95-K01-FinalReport.pdf>

- López, O. Posada, A. Pacheco, R.(1999). Empleo del elisa como medio de diagnóstico en la producción de PMSG. Recuperado de: <https://www.g77.org/pgtf/finalrpt/INT-95-K01-FinalReport.pdf>
- Luther, J. Grazul, A. Kirsch, J. Weigl, R. Kraft, K. Nsvanukraw, C. Pant, D. Reynolds, L. Y Redmer. D. (2007). El efecto de GnRH, eCG y tipo de progestina en la sincronización del estro después de la IA laparoscópica en ovejas. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092144880600294X?via%3Dihub>
- Muñoz, B. (2006). Importancia de la ecografía en el mejoramiento de la fertilidad equina. Chile. Recuperado de: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/ecografia_ultrasonido/13-Importancia_ecografia_en_fertilidad_equina.pdf
- Muñoz, R. (2012). Nanomedicina y sensores: alcance de la nanotecnología para el monitoreo y control de la glucosa en pacientes con diabetes. Colombia. Recuperado de: http://www.conicit.go.cr/prensa/boletincyt/palabras_investigador/Palabras-JVega-RMunoz.pdf
- Muñoz, B. (1995). Importancia del uso sistemático de la ecografía en el manejo reproductivo de la yegua fina sangre de carrera. Recuperado de: http://web.uchile.cl/vignette/avancesveterinaria/CDA/avan_vet_completa/0,1424,SCID%253D10197%2526ISID%253D478,00.html
- Noticias de la Ciencia. (2017). Una hormona biotecnológica reduce costos para inducir la ovulación en el ganado. Recuperado de:

<https://noticiasdelaciencia.com/art/25667/una-hormona-biotecnologica-reduce-costos-para-inducir-la-ovulacion-en-el-ganado>

- Orellana, S. (2015). Efecto de la gonadotropina coriónica equina (eCG) en la tasa de preñez con protocolos de IATF en vacas brown swiss. Recuperado de: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/8129/1/UPS-CT004903.pdf>
- Paredes, M. (2013). Características del ciclo estral, desarrollo embrionario y determinación de la tasa de preñez en yeguas criollas colombianas. Recuperado de: <http://bdigital.unal.edu.co/39461/1/07780191.2013.pdf>
- Paredes, M. Jiménez, C. y Hernández, A. (2012). Estudio del intervalo interovulatorio en yeguas criollas colombianas. Recuperado de: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/article/view/33128/33798>
- Ptaszynska, M. (2007). Compendio de reproducción animal. Recuperado de: <https://www.sinervia.com/sites/default/files/Compendio%20Reproduccion%20Animal%20Intervet.pdf>
- Peña, M. (2012). Factores reproductivos y metabólicos que intervienen en el proceso de la ovulación de la yegua. Recuperado de: <https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/1405/1/MONOGRAFIA%20MONICA%20PE%C3%91A.pdf>
- Rangel et al., (2009) Manual de prácticas de reproducción animal. Recuperado de: http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales_2013/Manual%20de%20Practicas%20de%20Reproduccion%20Animal.pdf
- Rensis, F. y López, G. (2014). Uso de gonadotropina coriónica equina para controlar la reproducción de la vaca lechera: una revisión. Recuperado de:

https://www.researchgate.net/publication/259880595_Use_of_Equine_Chorionic_Gonadotropin_to_Control_Reproduction_of_the_Dairy_Cow_A_Review

- Rivera, M. (2018). Fisiología reproductiva de la yegua I parte. Recuperado de: <http://referenciasparaconsultoriosmv.com/wp-content/uploads/2018/06/REFERENCIAS-36-15-21.pdf>
- Robles, L. (2010). Nanotecnología Farmacéutica. México. Recuperado de: <http://www.razonypalabra.org.mx/N/n68/9Villafuerte.pdf>
- Rojas, E. (2012). Un negocio que empieza a galopar. colombia – bogotá. Recuperado de: <https://www.dinero.com/inversionistas/articulo/un-negocio-empieza-galopar/162661>
- Roy, F. Maurel, M. Combes, B. Vaiman, D. Cribiu, E. Pobel, T. Deletang, F. Combarous, Y. y Guillou, F. (1999). The Negative Effect of Repeated Equine Chorionic Gonadotropin Treatment on Subsequent Fertility in Alpine Goats Is Due to a Humoral Immune Response Involving the Major Histocompatibility Complex. Recuperado de: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/61/1/209/2734847>
- Sagbay, C. (2012). Efecto de la eCG aplicada al momento de retirar el dispositivo de P4 sobre el porcentaje de preñez en vacas holstein port-parto. Recuperado de: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/2419/15/UPS-CT002426.pdf>
- Santillana, M. (2007). Prueba diagnóstica de preñez equina. Recuperado de: <https://www.engormix.com/equinos/articulos/prueba-diagnostica-prenez-equina-t26844.htm>
- Schroeder, H. (1993). Tratado de obstetricia veterinaria comparada. Bogota D. C, Colombia : Editorial Celsus

- Silva, M. (2005). Leucorreducción de sangre de equinos (*Equus caballus*) para transfusión. Recuperado de: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2005/fvs8561/doc/fvs8561.pdf>
- Sintex, (2005). Manejo farmacológico del ciclo estral del bovino. Recuperado de: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/72-manejo_farmacologico_ciclo_estral_bovino.pdf
- Sotelo, E. (2010). Aglutinación en látex, PCR, ASO, FR. Recuperado de: <https://es.scribd.com/doc/43927196/AGLUTINACION>
- Srinivas, K. (2017). Nano Tattoos as Biosensors for Medical Diagnostic Applications. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/319338489_Nano_Tattoos_as_Biosensors_for_Medical_Diagnostic_Applications
- Tscherig, B. (2019). Gestación y causas de aborto en equinos. Recuperado de: <https://rid.unrn.edu.ar/jspui/bitstream/20.500.12049/2601/1/Tscherig%2C%20Betiana.pdf>
- Ungerfeld, R.(2013). El tratamiento con una dosis única de gonadotropina coriónica equina restableció la producción de espermatozoides en un macho de ciervo azoospermico (*Ozotoceros bezoarticus*): reporte de un caso. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5904645/>
- Ungerfeld, R. Clemnte, N. Bongour, L. y Orihuela, A. (2014). La administración de gonadotropina coriónica equina a los carneros mejora su efectividad para estimular las ovejas anestesiadas (el "efecto del carnero"). Recuperado de:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432014002085?via%3Dihub>

- Urrejola, M. Soto, L. Zumaran, C. Peñaloza, J. Alvarez, B. Fuentevilla, I.y Haydar, Z. (2018). Sistemas de nanopartículas poliméricas I: de biodetección y monitoreo de glucosa en diabetes a bioimagen, nano- oncología, terapia génica, ingeniería de tejidos/ regeneración a nano odontología. Recuperado de: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022018000401490
- Valdés, D. (2013). Plan de empresa para la creación criadero de equinos “criadero hermanos Paz Valdés”. Recuperado de: <https://red.uao.edu.co/bitstream/10614/5258/1/TAD01639.pdf>
- Vásquez, S. Escobar, F. Colina, F. Y Hayden, S. (2004). Comportamiento reproductivo de yeguas pura sangre ingles en un criadero con partos al principio del año. México – zacatecas. Recuperado de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2004/bio041e.pdf>
- Vásquez, J. y Albornoz, J. (1945). Aborto de las yeguas. revista de medicina veterinaria. Recuperado de: <file:///D:/DOCUMENTOS/Downloads/Dialnet-AbortoDeLasYeguas-6107677.pdf>
- Vega, F. (2012). Caracterización ultrasonográfica de la unidad útero- placentaria y del feto en yeguas criollas colombianas con gestaciones normales. Colombia – ibagué. Recuperado de: <http://bdigital.unal.edu.co/7133/1/fernandoemiliovegadiaz.2012.pdf>
- Velásquez, L. Correa, A. Cuartas, L. Villamizar, D. y Angel, S. (2011). Evaluación de implantes de norgestomet reutilizados en protocolos de sincronización del estro en

vacas Brahman. Recuperado de:
<http://www.scielo.org.co/pdf/mvz/v18n1/v18n1a12.pdf>

- Villaraza, C. (2016). Producción de hormona gonadotrofina coriónica equina recombinante en células CHO-K1. Recuperado de: <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/1569/2.3.13.pdf>