



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Variación de las concentraciones séricas de alfa-fetoproteína en yeguas criollas colombianas durante el último tercio de la gestación**

**Karen Johanna Reina Rueda**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia Departamento de Salud Animal

Bogotá, Colombia

2022



# **Variación de las concentraciones séricas de alfa-fetoproteína en yeguas criollas colombianas durante el último tercio de la gestación**

**Karen Johanna Reina Rueda**

Tesis de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Salud Animal**

Director:

Harvey Lozano

DMV. MSc, PhD

Línea de Investigación:

Maestría en Salud y Producción Animal

Grupo de Investigación

Reproducción animal y salud de hato

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de medicina veterinaria y de zootecnia

Reproducción y Salud de Hato

2022



*(Dedicatoria o lema)*

*A mi esposo, mi mamá y sobrino por ser el motor de mi vida y a mi hermano por siempre creer en mí.*



# Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

---

Nombre

Fecha DD/MM/AAAA

Fecha

## **Agradecimientos**

Al grupo de reproducción animal y salud de hato por hacer posible este trabajo, sin su apoyo, ideas y acompañamiento esto no sería posible. Al Dr. Harvey Lozano Márquez por creer que podía y aceptarme como su estudiante, a la Dra. Claudia Jiménez por dar claridad a mis ideas y siempre impulsarme a dar lo mejor de mí, al Dr. Jorge Luis Zambrano Varón por sus consejos, su tiempo y apoyo incondicional y a la Dra, Andrea Ruiz por convertirse en el apoyo y compañía necesarios para hacer esta maestría.

También al criadero La Marqueza y al Dr. Jorge Hernán López (Q.E.P.D) por ayudar en el desarrollo del proyecto y en especial a la Dra. María Camila Ospina Buitrago por brindarme su tiempo, dedicación y conocimientos para la realización de los seguimientos.

## Resumen

### **Descripción de parámetros biométricos fetales y concentración de alfafetoproteína en yeguas de grupo racial criollo colombiano en el último tercio de la gestación**

La evaluación de la gestación por medio de biomarcadores y ultrasonografía para detectar patologías fetales y placentarias son herramientas importantes para el diagnóstico oportuno de patologías del feto y la placenta. La Alfafetoproteína (AFP) es una glicoproteína producida por el hígado fetal y a través de la placenta llega a sangre periférica de la madre durante la gestación. Este biomarcador ha sido utilizado en medicina humana para detectar patologías fetales y placentarias. Los objetivos del estudio fueron determinar la variación de la concentración de Alfafetoproteína en yeguas de grupo racial criollo colombiano en la Sabana de Bogotá durante el último tercio de la gestación y asociar la variación sérica de Alfafetoproteína con los cambios ultrasonográficos de la placenta y feto, el tipo de parto y la sobrevivencia neonatal. Dentro de los materiales y métodos se utilizó una población de 21 yeguas gestantes a las cuales se les tomaron muestras de sangre de la vena yugular y un examen ultrasonográfico rectal y transabdominal, para evaluar la unión útero placentaria, la frecuencia cardíaca del feto, órbita fetal y el diámetro de la arteria aorta fetal a partir del séptimo mes de gestación hasta el parto. La concentración de Alfafetoproteína fue medida por un ensayo de ELISA para AFP especie: *Equus caballus* de USBiological®. Se analizaron los datos por medio de medidas repetidas en el tiempo, para evaluar los cambios mes a mes. La concentración de Alfafetoproteína presentó un aumento a medida que avanzó la gestación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en su concentración en los meses de gestación evaluados, como tampoco una relación con los parámetros ultrasonográficos de feto y placenta. Los parámetros de viabilidad, el grosor útero placentario transabdominal y transrectal, el diámetro de la aorta y la órbita fetal aumentan a medida que avanza la gestación, a excepción de la frecuencia cardíaca la cual disminuye con el avance de la gestación. Se encontró un diámetro aórtico menor al reportado en razas de mayor tamaño, no se observó

un efecto de la edad, el peso de la yegua, el sexo de la cría y el método de reproducción sobre los parámetros de viabilidad. Esto con el fin de brindar una nueva herramienta para la evaluación de viabilidad fetal y patologías de la placenta en el último tercio de la gestación. Estos parámetros de viabilidad fetal tomados de yeguas con gestaciones normales sirven de guía para evaluar clínicamente el desarrollo de la gestación en yeguas criollas colombianas.

Palabras claves: Alfafetoproteína, placenta, equinos, gestación, feto

## Abstract

### **Description of fetal biometric parameters and Alpha-fetoprotein concentration in mares of the Colombian Creole breed group in the last third of gestation**

The evaluation of pregnancy through biomarkers and ultrasonography to detect fetal and placental pathologies are important tools for the early diagnosis of fetal and placental pathologies in horses. Alphafetoprotein (AFP) is a glycoprotein produced by the fetal liver and reaches the mother's peripheral blood through the placenta during pregnancy. This biomarker has been used in human medicine to detect fetal and placental pathologies. The objectives of the study are to determine the variation of the concentration of AFP in mares of the Colombian Creole racial group in the Bogota savanna during the last third of gestation and associate the serum variation of AFP with the ultrasound changes of the placenta and fetus, type of delivery and neonatal survival. A population of n=21 pregnant mares was used, from which blood samples were taken from the jugular vein, and a rectal and transabdominal ultrasonographic examination, this was used to evaluate the uteroplacental union, fetal heart rate, fetal orbit, and the diameter of the fetal aortic artery from the seventh month of gestation until delivery; AFP concentration was measured by an ELISA assay for AFP species: *Equus caballus* from USBiologycal®; the data was analyzed using repeated measures over time to assess month to month changes. Although AFP concentration showed an increase as gestation progressed, no statistically significant differences were found in its concentration in the gestational months evaluated, and there was no relationship with the ultrasonographic parameters of the fetus and placenta. Furthermore, it was found that viability parameters increase as gestation progresses, except for heart rate, which decreases with advancing gestation. An aortic diameter smaller than reported in larger breeds was found. No effect of age, the weight of the mare, the sex of the foal and

the method of reproduction was observed. This study seeks to provide a new tool for the evaluation of fetal viability and pathologies of the placenta in the last third of gestation and serve as a guide to clinically evaluate the development of pregnancy in Colombian Creole mares.

Key words: Alphafetoprotein, placenta, equine, gestation, fetus

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen.....</b>	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras .....</b>	<b>XIV</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>XV</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Capítulo 1 Revisión de Literatura .....</b>	<b>5</b>
1.1 Placentación equina.....	5
1.2 Hormonas durante el último tercio de la gestación.....	8
1.2.1 Progestágenos .....	8
1.2.2 Estrógenos.....	9
1.3 Pérdidas gestacionales.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.4 Biomarcadores en la gestación equina .....	10
1.4.1 Perfil hormonal .....	10
1.4.2 Alfafetoproteína.....	11
1.4.3 Proteínas de la fase aguda.....	13
1.4.4 Citoquinas .....	15
1.5 Evaluación viabilidad fetal.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.5.1 Frecuencia cardíaca .....	17
1.5.2 Diámetro aórtico .....	17
1.5.3 Órbita Ocular fetal .....	18
1.5.4 Espesor conjunto de la unión útero placentaria .....	18
1.5.5 Evaluación pulsos periféricos .....	19
<b>2. Capítulo 2 Variación de las concentraciones séricas de Alfafetoproteína en yeguas criollas colombianas durante el último tercio de la gestación.....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
2.1 Resumen .....	23
2.2 Introducción .....	25
2.3 Materiales y métodos.....	26
2.3.1 Metodología del estudio .....	26
2.3.2 Parámetros ultrasonográficos.....	27
2.3.3 Medición Alfafetoproteína.....	27
2.3.4 Evaluación de la placenta.....	31
2.3.5 Evaluación del neonato .....	31
2.4 Resultados.....	32
2.4.1 Información clínica .....	32
2.4.2 Evaluación parámetros ultrasonográficos .....	32
2.4.3 Medición sérica Alfafetoproteína .....	36
2.5 Discusión .....	38
<b>3. Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>47</b>
3.1 Conclusiones .....	47
3.2 Recomendaciones .....	48

---

<b>A. Anexo: historia clínica .....</b>	<b>49</b>
<b>B. Anexo: Nombrar el anexo B de acuerdo con su contenido.....</b>	<b>51</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>53</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 2-1:</b> Ultrasonidos espesor conjunto unión útero placentaria. En yegua de grupo racial criollo colombiano de 11 meses de gestación...	15
<b>Figura 2-2:</b> Ecocardiografía fetal en yegua de grupo racial criollo colombiano, vía transabdominal utilizando transductor convexo de 2-3.5 MHz en modo B y M. En yegua de grupo racial criollo colombiano con 9 meses de gestación.....	16
<b>Figura 2-3:</b> Ultrasonido transabdominal en yegua de grupo racial criollo colombiano, con 9 meses de gestación, donde se ubica la arteria aorta abdominal fetal y se realizan tres mediciones.....	16
<b>Figura 2-4:</b> Medición de ancho y largo de la órbita fetal .....	17
<b>Figura 2-5:</b> Imagen vía transrectal del espesor conjunto de la unión útero placentario a nivel de la estrella cervical.....	17
<b>Figura 2-6:</b> Regresión lineal del grosor útero placentario transabdominal (mm) y los días de gestación .....	34
<b>Figura 2-7:</b> Regresión lineal de la frecuencia cardíaca (lat/min) y la duración de la gestación, entre el mes 7 y 11 de gestación (21=yeguas) .....	35
<b>Figura 2-8:</b> Regresión lineal del diámetro de la aorta fetal (mm) y los días de gestación entre el día 180 y el 330 de gestación .....	36
<b>Figura 2-9:</b> Regresion lineal del diametro del globo ocular (mm) y los días de gestacion en los ultimos 5 días de gestación .....	37
<b>Figura 2-10:</b> Regresión lineal del grosor útero placentario transrectal (mm) y los días de gestación .....	38
<b>Figura 2-11:</b> Regresión lineal AFP (pg/mL) en yeguas de grupo racial criollo colombiano en el último tercio de gestación .....	39
<b>Figura 2-12:</b> Diferencias en la concentración sérica de AFP (pg/mL) durante el mes 7-11 de la gestación en yeguas de grupo racial criollo colombiano de acuerdo con el sexo de la cría.....	40
<b>Figura 2-13:</b> Relación en la concentración sérica materna de AFP (pg/mL) de acuerdo con el método de reproducción en los últimos cinco meses de gestación.....	40

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 2-1:</b> Parámetros de evaluación de viabilidad fetal y placentaria.....	35
<b>Tabla 2-2:</b> Promedios de la concentración mensual de AFP (pg/mL), error estándar, mínimos y máximos en yeguas de grupo racial criollo colombiano durante los meses 7 y 11 de gestación .....	38



# Introducción

La evaluación de la gestación equina en el último tercio se ha convertido en un reto diagnóstico para médicos veterinarios; a pesar de esto la investigación en este ámbito no ha avanzado al mismo nivel que las técnicas reproductivas para aumentar las tasas de preñez (Bucca, De Oliveira, Cunanan, Vinardell, & Troedsson, 2020; Troedsson, 2007). La dificultad que se presenta al tener un feto de gran tamaño y un largo y variable periodo de gestación hacen que los estudios para la evaluación del feto y la gestación sean difíciles de realizar (Fowden, Giussani, & Forhead, 2020; Satué, Felipe, Mota, & Muñoz, 2011).

Dentro de las herramientas diagnósticas con las que se cuentan hoy en día para evaluar viabilidad fetal y placentaria se encuentra la ultrasonografía como un método no invasivo y de fácil acceso, su uso puede ayudar a detectar cambios tempranos en la morfología de la placenta y a evaluar la viabilidad fetal (Bucca, Fogarty, Collins, & Small, 2005a; V. Reef, Vaala, Worth, Sertich, & Pamela, 1996; CD. Renaudin, Troedsson, Gillis, King, & Bodena, 1997). Se ha descrito que en yeguas con gestaciones en riesgo, el monitoreo ultrasonográfico intensivo para la detección temprana de cambios y su respectivo tratamiento aumentan la probabilidad que esta pueda producir un potro vivo (Carricka, Beggb, Perkinsc, & O'Meara, 2010); a pesar de esto, la sensibilidad y especificidad de la ecografía no están suficientemente estudiadas (Canisso, Ball, Scogging, et al., 2015).

En conjunto con la ultrasonografía, las hormonas producto de la unión útero placentaria se han utilizado para evaluar posibilidades de riesgo durante la gestación (Canisso et al., 2017; E. L. Legacki et al., 2019). Se ha demostrado que los cambios en la concentración de estrógenos y progestágenos en suero materno después del día 241 de gestación son significativamente diferentes entre yeguas que parieron potros sanos o muertos (Shikichi et al., 2017). Sin embargo, la inherente reacción cruzada de los inmunoensayos contra los progestágenos medidos en la gestación tardía, imposibilita la determinación de los cambios en progestágenos específicos, lo cual puede ser valioso para el diagnóstico del funcionamiento anormal de la placenta en yeguas (Wynn, Esteller-Vico, et al., 2018).

Con respecto a los estrógenos, la concentración de  $17\beta$  estradiol cambia rápidamente en el plasma de yeguas con placentitis ascendente, contrario al sulfato de estrona, el cual cambia solo muy cerca del aborto (Canisso et al., 2017), razón por la cual dan una referencia temprana del estado de la placenta y el feto.

Se ha despertado un creciente interés en la medición de biomarcadores como una herramienta útil en el diagnóstico de patologías del feto y la placenta (Bazzano, Marchegiani, Troisi, McLean, & Laus, 2022; Canisso, Loux, & Lima, 2020; C.E. Fedorka et al., 2021; A. E. Hughes et al., 2019). Ésta investigación se enfoca en la medición de Alfetoproteína, una glicoproteína producida mayormente por el hígado fetal, la cual ha sido utilizada como marcador de patologías fetales en humanos y se ha reconocido como un potencial marcador en sangre para el diagnóstico temprano de septicemia en el feto (Buhimschi & Buhimschi, 2012). Se han realizado mediciones de alfa- fetoproteína en equinos y hoy en día se reconoce su presencia en altas concentraciones en líquido amniótico y alantoides del feto en condiciones normales; la concentración de Alfetoproteína en sangre de la yegua gestante es baja, pero podemos medirla y estudiar su variación en casos de patologías de la placenta (Canisso, Ball, Scogging, et al., 2015). Esta glicoproteína solo está presente en altas concentraciones séricas cuando hay patologías de la placenta, placenta previa, pérdida embrionaria o aborto (Canisso, Ball, Scogging, et al., 2015; Carleigh E. Fedorka, Ball, et al., 2021; Vincze et al., 2015).

Como consecuencia de la falta de pruebas diagnósticas sensibles y específicas en casos de patologías de placenta y feto en equinos, el objetivo de esta investigación es estudiar la variación de la concentración de alfa-feto proteína equina en yeguas de grupo racial criollo colombiano en la Sabana de Bogotá durante el último tercio de la gestación. Y con estos valores poder establecer si existe una asociación entre estos y los parámetros ultrasonográficos de placenta y feto, el tipo de parto y la sobrevivencia neonatal.





# 1. Capítulo 1 Revisión de Literatura

## 1.1 Placentación equina

El embrión equino después del día 11 post ovulación viaja a través del lumen uterino, propulsado por contracciones uterinas causadas en respuesta a síntesis de prostaglandinas por parte del embrión (Ginther, 2021) y una vez la vesícula embrionaria cesa su migración alrededor del lumen uterino, y queda fijo en la base de uno de los cuernos uterinos al día 16-17 de gestación, el saco vitelino no puede cumplir con las cada vez más altas necesidades del embrión en crecimiento, por esto es gradualmente reemplazado por el alantocorión, con la regresión del saco vitelino este se va incorporando al cordón umbilical, donde se convierte en un vestigio que se puede ver al parto dentro del infundíbulo donde el cordón umbilical está unido al alantocorión (Vilaregut, Lores, & Wilsher, 2021).

Los equinos presentan una placentación epiteliocorial, en este tipo de placentación la porción externa que envuelve al feto (corion) está en contacto directo con el útero de la madre (Morel, 2016). El alantocorión que se forma como una fusión del alantoides fetal (membrana extraembrionaria que emerge del tracto digestivo) y el corion, toma una apariencia aterciopelada, creada por una fina microvellosidad sobre toda la superficie; por lo tanto, la placenta equina se denomina difusa. Estas microvellosidades se organizan en paquetes microscópicos, los cuales invaden las invaginaciones en el epitelio uterino y se denominan micro cotiledones, y su unión con el útero se desarrolla durante determinado periodo de tiempo, estando completo y funcional para el día 150 de gestación **(Challis, Matthews, Gibb, & Lye, 2000)**.

La placentación inicia hacia el día 30- 40 después de la ovulación días posteriores a la implantación, la cual se caracteriza por la coexistencia de las copas endometriales, el

trofoblasto invasivo derivado del anillo coriónico del embrión; el cual estará activo hasta los cuatro meses de gestación y el alantocorión no invasivo el cual habilita el intercambio materno-fetal hasta el parto (Chavatte-Palmer, Derisoud, & Robles, 2022). El anillo coriónico se forma alrededor del embrión, siempre en la región entre el alantoides en expansión y la regresión del saco vitelino, y corresponde a una banda de células epiteliales en forma de columnas, células del anillo coriónico binucleadas invaden el endometrio materno entre el día 36 y 38 post ovulación (McKinnon, Squires, Vaala, & Varner, 2011).

La gestación equina se caracteriza por la presencia de una estructura única denominada copas endometriales, las cuales se forman aproximadamente al día 35 después de la ovulación, las células que forman las copas endometriales provienen del embrión, específicamente del trofoblasto del anillo coriónico, estas células invaden el endometrio materno en forma de anillo alrededor del ombligo en desarrollo en la base del cuerno uterino (Kelleman, 2014).

Para el día 55 a 70 de gestación las copas endometriales están conformadas por células binucleadas derivadas del trofoblasto con poco o ningún estroma entre ellas y vasos linfáticos y sanguíneos con tamaños variables (McKinnon et al., 2011). Su duración es de 60 a 100 días momento en el cual hay un aumento en el número de leucocitos alrededor del estroma endotelial, los cuales invaden y destruyen las copas hasta que eventualmente se desprenden de la superficie del endometrio (Chavatte-Palmer et al., 2022). Las copas endometriales producen la hormona gonadotropina coriónica equina (eCG), la cual estimula los ovarios y ocasiona desarrollo folicular, seguido por ya sea ovulación o luteinización (sin ovulación), es así como se producen los cuerpos lúteos accesorios los cuales aumentan la concentración de progesterona sistémica (Kelleman, 2014). La segunda función de las copas endometriales es la fuerte estimulación del sistema inmune materno por antígenos fetales paternos codificados por el complejo mayor de histocompatibilidad (Antczak, 2020).

El alantocorión es la forma definitiva de la placenta y soporta el feto dentro del útero, está formada por las glándulas endometriales, la vena uterina, arterias uterinas, los microcotiledones, epitelio uterino la apertura de las glándulas uterinas y los vasos fetales (Chavatte-Palmer et al., 2022; McKinnon et al., 2011). Gracias a esto provee el intercambio respiratorio y de nutrientes de la yegua al feto, entre ellos oxígeno, agua más electrolitos,

carbohidratos, aminoácidos y lípidos y facilita la salida de dióxido de carbono, agua con electrolitos, urea más ácido úrico, creatinina, bilirrubina y hormonas (Donnelly, 2019).

Además, la placenta es un órgano endocrino activo transitorio con la síntesis y metabolismo de hormonas importantes para el mantenimiento y desarrollo normal del feto (Renaudin, Liu, Troedsson, & Schrenzel, 1999). Durante el segundo y tercer trimestre de gestación, el compartimento feto-placenta produce grandes cantidades de progestágenos y estrógenos, esta producción hormonal ocurre en conjunto con las glándulas adrenales y gónadas fetales, así como también con los tejidos placentarios (Kelleman, 2014). Por esto una de las funciones más importantes de la placenta es la producción de progestágenos desde el día 70 de gestación, los cuales tienen la capacidad de mantener la quietud miometrial (Klein, 2016). La producción de estrógenos en contraste requiere de la interacción entre el feto y la placenta, a pesar de la alta concentración de estos su rol durante la gestación equina permanece sin ser clara (El-Sheikh, et al., 2020). Se entrará en detalle de su producción en el numeral 1.2.

La evaluación histológica de la placenta equina ha revelado que la superficie coriónica muestra células cuboidales a columnares en las aéreas areolares (Pazinato et al., 2016), un corion compuesto por células trofoblásticas epitelioides cuboidales con núcleo y a medida que avanza la gestación (día 30) son evidentes las células del trofoblasto cuboidales hacia el epitelio luminal del endometrio, una densa acumulación de capilares en el estroma endometrial y una distribución aleatoria de los microcotiledones (McKinnon et al., 2011).

Se ha buscado evaluar si existen diferencias histológicas entre yeguas multíparas con mayor edad y nulíparas yeguas jóvenes en cuanto a desarrollo placentario y se ha encontrado que en yeguas multíparas los microcotiledones tienen forma irregular y hay una gran variación de diámetro y altura, también se describió que la densidad de los microcotiledones es más baja en la superficie del alantocorion en yeguas primaras que en yeguas multíparas y de mayor edad, esto se ha asociado a zonas fibróticas en las vellosidades de yeguas multíparas (Abd-Elnaeim, Leiser, Wilsher, & Allen, 2006).

## 1.2 Hormonas durante el último tercio de la gestación

Entre el feto, la placenta y el endometrio materno, se presenta producción útero placentaria para todas las hormonas peptídicas y esteroidales necesarias para mantener el estado de gestación, y promover el crecimiento placentario y fetal, donde las estructuras placentarias influyen la producción de hormonas placentarias y viceversa (Sandra & Wilsher, 2009).

### 1.2.1 Progestágenos

Ha sido aceptado por mucho tiempo que la progesterona es la hormona que por sí sola es requerida para establecer y mantener la gestación, siendo esta hormona un pregnano, lo que significa que, como el cortisol, tiene una estructura esteroidea de 21 carbonos y es la única dentro de los esteroides en tener su propio receptor (Legacki et al., 2016). La unión de la progesterona a su receptor mantiene la quiescencia miometrial, y sirve como precursor para otros pregnanos, los cuales son metabolitos activos de la progesterona, durante la gestación en equinos (Wynn, Ball, et al., 2018).

La progesterona solo está presente en circulación periférica de la madre durante el primer trimestre de gestación y a partir de la mitad de la gestación esta hormona es generalmente indetectable, por debajo de 1ng/mL, mientras los otros progestágenos asumen mayor significancia cuantitativa alcanzando concentraciones en el plasma materno típicamente entre 5 y 50 ng/mL; para la gestación tardía, la concentración de algunos progestágenos puede exceder los 500 ng/ml (Ousey, 2006). Se conoce que la yegua produce otro tipo de pregnanos los cuales, durante este periodo, pueden ser bioactivos y por lo tanto cumplen una función importante en el mantenimiento de la gestación. Se conoce un número considerable de estos por su abundancia o por su posible bioactividad durante la gestación tardía, los cuales incluyen: 5 $\alpha$ - dihydroprogesterona, alopregnenolona, 3 $\beta$  hidroxiprogestano-20-uno, 20 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnano-3-uno, 5 $\alpha$ -pregnano-3 $\beta$ ,20 $\alpha$ -diol, y 5 $\alpha$ -pregnano-3 $\beta$ ,20 $\beta$ -diol. De estos el 20 $\alpha$ 5P y el  $\beta$  $\alpha$ -diol son los más abundantes, alcanzando concentraciones mayores a 300ng/ml, en la gestación tardía (Wynn, Ball, et al., 2018).

El termino progestágeno significa que la sustancia o metabolito es similar a progesterona y el termino progestina también es a menudo utilizado de manera similar, o es reservado

para medicamentos que tienen función similar a la progesterona (Kelleman, 2014). Días antes del parto (2-3) la concentración de pregnanos incluida la pregnenolona disminuye, se ha teorizado que está asociado a un arresto en la síntesis de pregnanos (Legacki et al., 2016). En cuanto a su medición para evaluar gestaciones en riesgo se ha descrito que su aumento puede estar relacionado con un compromiso fetal y placentario (Fedorka et al., 2021)

## 1.2.2 Estrógenos

Los estrógenos dentro del sistema materno continúan aumentando en la gestación tardía, alcanzando un pico, entre el día 201 y 280, de aproximadamente 8 ng/mL, los dos estrógenos principales, son los equinos específicos, equilina y equilenina los cuales son estrógenos de anillo B insaturados, no dependientes de colesterol (Morel, 2016). Tanto los estrógenos, como los progestágenos son producidos por la unión útero placentaria, pero los estrógenos se originan de un tejido fetal diferente, los precursores de estrógenos son producidos por las gónadas fetales, y son aromatizados por la placenta, dando lugar a la estrona y al estradiol, producidos desde la dehidroepiandrosterona (DHA), mientras el equilin y equilenin son producidos desde pirofosfato de farnesilo (Ousey, 2006).

Estudios realizados en equinos utilizando letrozole un potente y específico inhibidor de la aromatasa, el cual permite la inhibición de esta enzima (aromatasa) responsable de la conversión de andrógenos a estrógenos en la placenta, han demostrado que el peso de los fetos en este grupo es menor que en el grupo control, además de encontrar una alteración en la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular y de la angiopoyetina 1 (moléculas implicadas en la regulación positiva de la angiogénesis) en el corioalantoides (Haneda et al., 2021).

La concentración total de estrógenos en sangre materna disminuye gradualmente entre las dos y tres semanas preparto, alcanzando niveles basales antes del parto, a pesar de esta disminución, los estrógenos son esenciales para el parto en la yegua (Ousey, 2006). Teniendo en cuenta que la gestación equina está asociada con altas concentraciones de estrógenos periféricos derivados de la unidad fetoplacentaria, un declive de estradiol y/o sulfato de estrona es indicativo de daño o anomalía feto placentaria (El-Sheikh et al., 2020). Es por esto que el uso de estrógenos y andrógenos para evaluación del estado fetal

y placentario ha derivado estudios como el realizado por Canisso en 2016 (Canisso et al., 2017) utilizando yeguas con placentitis inducida experimentalmente donde se evidencio que el sulfato de estrona disminuyo solamente cerca del aborto, por lo cual no sirvió de predictor temprano de aborto y el 17 $\beta$ estradiol disminuyo días antes del parto o aborto, dando mejores resultados que el sulfato de estrona, esta disminución en la concentración de estrógenos se asoció con un declive de la concentración en el corioalantoides (El-Sheikh et al., 2020).

La medición de andrógenos como el DHA y la testosterona a pesar de encontrar en altas concentraciones no mostraron diferencias significativas entre grupos de yeguas control y yeguas con placentitis (Canisso et al., 2017) síntesis de andrógenos fetales cesa cuando el feto muere, y está asociada con un rápido declive en las concentraciones de estrógenos, estos cambios en los perfiles esteroidales ocurren a los pocos días de la muerte fetal (Conley, 2016).

## **1.3 Evaluación de la viabilidad durante la gestación tardía en equinos: biomarcadores y ultrasonido**

### **1.3.1 Biomarcadores en la gestación equina**

Los biomarcadores son definidos como uno o un grupo de moléculas individuales medidas por su expresión o concentración en tejidos, células o fluidos para diferenciar entre un estado de enfermedad y un estado control o normal (Mayeux, 2004; Tang, Yuan, & Chen, 2022). Los biomarcadores no son una prueba diagnóstica, si no un indicador de que un cambio temprano está ocurriendo y puede llevar a la enfermedad clínica (Grandjean, 1995).

### **1.3.2 Perfil hormonal**

Los estrógenos y progestágenos son los parámetros hormonales tradicionalmente evaluados para evaluar el compromiso fetoplacentario, su evaluación en plasma requiere de múltiples muestras para la correcta interpretación de tendencias en lugar de valores

absolutos (Bucca, 2006). La explicación de la importancia de estas mediciones se encuentra especificada en el numeral 1.2.

### 1.3.3 Alfafetoproteína

Desde su descubrimiento, se ha reconocido a la alfa fetoproteína como un marcador de bienestar fetal, en 1956 se describió como una nueva proteína sérica presente en 19 fetos humanos abortados legalmente y en todos los fetos examinados se encontró una nueva fracción proteica en una concentración considerable, la cual en la tira de papel de electroforesis se ubicaba entre la albumina y la  $\alpha$ -globulina (Bergstrand & Czar, 1956). Varios investigadores han sugerido la asociación de los elevados valores en suero materno de Alfafetoproteína y el pronóstico adverso del desenlace de la gestación está asociada con cambios patológicos en la placenta (Huerta-Enochian, Katz, & Erfurth, 2001), Los altos niveles en suero materno de Alfafetoproteína están asociados con un tamaño pequeño del feto en relación con la edad gestacional, con o sin presentación de parto prematuro debido a un reducido tamaño al nacimiento (Gaccioli, Aye, Sovio, Charnock-Jones, & Smith, 2018).

La Alfafetoproteína está clasificada como miembro de la superfamilia del género albuminoide, conformada por la albumina, la proteína de transporte de la vitamina D y la alfa albumina (Mizejewski, 2001), es la mayor glicoproteína en el feto en desarrollo de mamíferos y es producida por las células del endodermo del saco vitelino y el hígado (Kamata, Akahoshi, & Ishii, 2015) La síntesis de alfa fetoproteína comienza con la hematopoyesis del embrión en el saco vitelino, el lugar para la síntesis de todas las proteínas del suero durante el desarrollo embrionario inicial. Después, cuando la hematopoyesis fetal inicia, el hígado produce alfa fetoproteína y otras proteínas séricas, más tarde la síntesis de alfa fetoproteína va a ser realizada principalmente por el hígado, y el tracto gastrointestinal en desarrollo puede llevar a producir bajos niveles (Rizzo, Galgano, Mutinati, & Sciorsci, 2019). Durante la gestación esta glicoproteína del plasma fetal pasa a la orina y es excretado al líquido amniótico, y así producida por el feto atraviesa las membranas fetales y la placenta para aparecer en el suero materno (Schieving et al., 2014).

La producción de Alfafetoproteína en equinos, es similar a la producción en humanos, donde se caracteriza por un aumento temprano, seguido de una meseta con la mayor

concentración, y finalmente un descenso hasta el parto, los niveles en suero materno de Alfafetoproteína, este autor reporto un promedio de 72.9 pg/ml se han correlacionado con la edad fetal, problemas con la gestación (falla en la concepción, placentitis, y pérdida embrionaria), y con la edad de la yegua: yeguas con mayor edad tienen menor concentración de Alfafetoproteína (Vincze et al., 2015).

Dentro de las funciones de la Alfafetoproteína encontramos el transporte de nutrientes, iones y lípidos esenciales para el crecimiento y desarrollo fetal. En fetos de mamíferos se ha asociado la Alfafetoproteína con la unión a estrógenos, propiedades antioxidantes e inmunoreguladoras (Isani et al., 2016). Schieving reportó que las cuatro proteínas de la familia albuminoide tienen un papel en el transporte de estrógenos, también muestran funciones que incluyen quimiotaxis, recoger radicales libres de oxígeno, y la peroxidación de lípidos. A pesar de que se han descrito y postulado estas funciones para Alfafetoproteína, mucho de su exacto papel biológico falta por dilucidar (Schieving et al., 2014).

Se han realizado mediciones de Alfafetoproteína en diferentes especies domésticas, tales como bovinos donde se encontró que la concentración de está en suero fetal líquido amniótico y alantoideo era mayor durante el tercer y cuarto mes de gestación y después declina hasta el parto (Smith, Lai, Robertson, Church, & Lorscheider, 1979), un patrón similar se observó en cerdos, donde este biomarcador aparece como la mayor proteína en plasma durante la gestación temprana, en el feto y los niveles van declinando medida que avanza la gestación (Robertson, Saunders, & Lorscheider, 1984).

En equinos se han realizado estudios para evaluar la presencia de Alfafetoproteína en fluidos fetales y en sangre periférica de la yegua gestante (Canisso, Ball, Scogging, et al., 2015; Carleigh, Fedorka, Ball, et al., 2021; Vincze et al., 2018), en estos se encontró que su concentración estaba elevada en el plasma de yeguas con placentitis ascendente inducida experimentalmente, y también en yeguas que desarrollaron placentitis de forma natural, este aumento puede ser por regulación y/o un aumento en la permeabilidad a través de la placenta. Por cualquier mecanismo, este hallazgo provee una nueva área de investigación ya que se ha confirmado que la Alfafetoproteína, es una proteína producida por el feto (está presente en fluidos fetales), y puede ser detectada en la circulación materna y que enfermedades como placentitis pueden aumentar la concentración de este

biomarcador en la circulación materna (Canisso, Ball, Scogging, et al., 2015), También se confirmó que en yeguas Lipizanas con pérdida embrionaria la concentración de los niveles de este biomarcador eran significativamente mayor en comparación con yeguas que tenían gestaciones normales (Vincze et al., 2015).

Para la detección de los niveles de Alfafetoproteína se han implementado métodos de quimioluminiscencia (Salameh et al., 2018), espectrómetro de masas (Isani et al., 2016), y también inmunoensayo enzimático (Huerta-Enochian et al., 2001). Además de la Alfafetoproteína se han evaluado otros marcadores dentro de los cuales se encuentran el suero amiloide A y haptoglobulina los cuales no mostraron cambios significativos en su concentración en suero de la yegua gestante en casos de placentitis (Canisso, Ball, Cray, et al., 2015; Canisso et al., 2014).

### 1.3.4 Proteínas de la fase aguda

Las proteínas de la fase aguda son proteínas de la sangre que pueden ser utilizadas para evaluar la respuesta del sistema inmune a infección, inflamación o trauma (Eckersall & Bell, 2010). Dentro de estos el suero amiloide A es la principal proteína de fase aguda en el equino (Jacobsen & Andersen, 2007) y es producida mayormente por el hígado en respuesta a citoquinas inflamatorias secretadas por la activación de monocitos (Vietri et al., 2020).

Dentro de las investigaciones que se le han realizado en torno a esta proteína en reproducción equina se encuentran su relación en yeguas con endometritis y placentitis (Canisso et al., 2014; Coutinho da Silva, Canisso, Macpherson, Johnson, & Divers, 2013; Krakowski et al., 2020; Mette et al., 2010). Estudios para evaluar su concentración en casos de endometritis inducida experimentalmente con *E.Coli* han demostrado que se presenta un aumento en la síntesis de suero amiloide A por el endometrio (Mette et al., 2010).

Se ha buscado evaluar los cambios en su concentración en el periparto, posparto y celo del potro; y se ha descrito una concentración fisiológica antes del parto (39 µg/ml) un aumento al día 9 post parto (45µg/ml) y un declive drástico 9 días de la ovulación post parto (30µg/ml) (Krakowski et al., 2020).

También se han evaluado los cambios en su concentración después del desarrollo experimental de placentitis en último mes de gestación, encontrando un aumento significativo en su concentración dos días después de la inoculación de la bacteria para inducir placentitis y hasta el aborto (Canisso et al., 2014; Coutinho da Silva et al., 2013). Al realizar la medición de esta proteína de forma mensual en yeguas con gestaciones normales se asoció su aumento en muestras aisladas con vacunación e inflamación no relacionada con la gestación al momento de la toma de la muestra, cuestionando la especificidad de esta medición para la detección de inflamación relacionada a la gestación (Bucca et al., 2020) A pesar de los resultados encontrados en este marcador se debe tener claro que su uso es de utilidad pero no es específica para patologías del feto y de la placenta (Canisso et al., 2014).

Además del amiloide A, otra de las proteínas estudiadas es la haptoglobina se ha medido su concentración a lo largo de la gestación teniendo una disminución significativa al tercer mes en comparación con los dos primeros meses, y a partir del quinto mes un aumento progresivo y significativo hasta el décimo mes de gestación y su disminución al final de la gestación (Satué, Marcilla, Medica, Ferlazzo, & Fazio, 2018).

Para evaluar su posible uso en diagnóstico oportuno de enfermedades placentarias se evaluó su concentración después de la inoculación bacteriana para el desarrollo de placentitis y se encontró un aumento en su concentración 3 días después de la inoculación y 3 días antes de presentarse el aborto (Canisso et al., 2014). Un estudio donde se evaluó su aumento en líquido alantoico concluyó que la evaluación transrectal del grosor combinado de la unión útero placentaria fue el primer cambio detectable en yeguas con placentitis precediendo el aumento de proteínas de la fase aguda (Beachler et al., 2019).

A pesar de que se ha considerado a las enfermedades infecciosas de la placenta como entidades localizadas y no enfermedades sistémicas este aumento en la concentración de proteínas inflamatorias se asocian a la respuesta inmune de la yegua en respuesta a infección (Canisso et al., 2014; Coutinho da Silva et al., 2013).

### 1.3.5 Citoquinas

Las citoquinas son proteínas pequeñas secretadas por muchos tipos de células, entre ellas macrófagos y células T auxiliares. Las citoquinas pueden ser producidas en y por tejido de nervios periféricos durante procesos fisiológicos y patológicos, por macrófagos, células de mast, células endoteliales, y células de Schwann residentes y reclutados. Tienen un efecto de interacción y comunicación entre las células, estas pueden actuar en la misma célula que las secreta (acción autocrina), en células cercanas (acción paracrina), o en algunos casos en células distantes (acción endocrina) (Zhang & An, 2007).

Las citoquinas se han clasificado de acuerdo a su función o estructura, entre estos las interleuquinas son un grupo que son mayormente moduladores de las respuestas inmunes e inflamatorias donde se encuentran más de setenta citoquinas entre ellas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 (Antczak, Cañete, Chen, Belle, & Yu, 2022). Las quimiocinas las cuales son definidas por su secuencia de aminoácidos y la disposición de residuos específicos de cisteína. La función más estudiada de las quimiocinas es la red de migración celular, particularmente de los leucocitos (Hughes & Nibbs, 2018). Los interferones son citoquinas clave en la respuesta antiviral, se describen tres tipos (tipo I, tipo II y tipo III) basándose en sus características estructurales, uso de receptores y actividad biológica (Capobianchi, Uleri, Caglioti, & Dolei, 2015). Las linfoquinas son los productos de la activación de linfocitos, están implicados en casi todas las áreas de la respuesta inmune (Rosenstreich & Wahl, 1979). Y el factor de necrosis tumoral el cual es una citoquina pleiotrópica que media apoptosis, proliferación celular, inmunomodulación, inflamación, replicación viral, alergias, entre otros, tiene dos tipos de receptores (tipo I y tipo II) los cuales se expresan solo en células del sistema inmune y células endoteliales (Aggarwal, 2000).

En equinos se ha evaluado la acción de citoquinas en el útero de la yegua, dando como resultado que endotoxinas estimulan la síntesis de citoquinas pro y antiinflamatorias entre las cuales están IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-8, e IL-10, y se ha asociado este aumento en la expresión de citoquinas en el tejido endometrial con una predisposición para el desarrollo de endometritis persistente (Mette et al., 2010).

En cuanto a la acción de las citoquinas durante la gestación se han realizado para evaluar la presencia de citoquinas en endometrio y corioalantoide, donde se ha reportado que la

IL-6 aparece predominantemente en corioalantoide y no en endometrio después de la infección, actuando de forma antiinflamatoria (Carleigh, Fedorka, Scoggin, et al., 2021). Se ha concluido también que la presentación de infección placentaria en yeguas lleva a una respuesta inmune activa, caracterizada por un aumento de IL-2, IL-5, IL-6, IL-10 y factor de necrosis tumoral (Fedorka et al., 2021).

### **1.3.6 Ultrasonografía**

La ultrasonografía ha sido una herramienta ampliamente utilizada en reproducción equina, el modo-B, o bidimensional es una técnica rutinaria para el diagnóstico del ciclo estral, gestación, determinación del género fetal y evaluar el crecimiento fetal (Kotoyori et al., 2012). El término modo-B hace referencia al brillo de los puntos o pixeles que se observan en la pantalla del ultrasonido el cual es representado por una escala de grises que se extienden desde el blanco muy brillante o ecogénico) hacia el negro (sin eco perceptible, anecoico) (Ginther, 2007).

Además del modo-B, existen el modo-M, el cual es tiempo y movimiento, la imagen se visualiza moviéndose en el tiempo, y el modo-D que hace referencia a Doppler en el cual se detectan frecuencias de desplazamiento Doppler las cuales son reflejadas desde los eritrocitos en movimiento ya sea alejándose o acercándose al transductor (Ginther, 2007, 2014; McKinnon et al., 2011).

Los transductores son los responsables de transportar la energía acústica desde el sistema de ultrasonido al cuerpo (De Luca et al., 2018), existen diferentes tipos de transductores, la posición, el tamaño, y las propiedades del objeto a observar determinan la forma, el tamaño, el tipo y la frecuencia del transductor requerido (Lee & Roh, 2017). En reproducción equina el acercamiento transabdominal utilizando un transductor curvilíneo de 2 – 5 MHz visualiza el abdomen de un equino adulto (Barton, 2011) y vía transrectal con un transductor de alta frecuencia, lineal de 5-7 MHz se observan el útero, ovarios así como el diagnóstico y mantenimiento de la gestación (Bailey et al., 2012; Silva, Pantoja, Puoli, & Meira, 2015), estos dos permiten visualizar el feto equino hasta termino (Bucca, Fogarty, Collins, & Small, 2005).

Realizar el monitoreo fetal es prometedor para mejorar la habilidad de diagnosticar distrés fetal y con esto poder intervenir apropiadamente y así disminuir la mortalidad y morbilidad perinatal (Reef et al., 1996), este monitoreo intensivo para detección de anomalías y su consecuente tratamiento ha demostrado que aumenta la probabilidad que yeguas con gestaciones en riesgo produzcan un potro vivo (Carricka et al., 2010). En equinos se ha propuesto un perfil biofísico el cual fue creado con base en la frecuencia cardíaca, el diámetro aórtico, la profundidad máxima de líquidos fetales, la actividad fetal y el contacto y grosor útero placentario (Bucca et al., 2005; Reef et al., 1996; Vincze, Baska, Papp, & Szenci, 2019).

### **1.3.7 Frecuencia cardíaca**

Para la evaluación de la frecuencia cardíaca fetal se utiliza el modo-B para identificar el corazón y modo-M para determinar los latidos por minuto. Patrones anormales en la frecuencia cardíaca fetal incluyen taquicardia, bradicardia y arritmias (Bucca et al., 2005). La bradicardia en el feto es una adaptación al estrés in útero, debido más comúnmente a hipoxia, al disminuir la frecuencia cardíaca, el feto prolonga la exposición de la sangre fetal a la sangre materna, aumentando el tiempo de equilibrio del gas disuelto a través de la placenta y mejorando el oxígeno de la sangre fetal. El feto también altera la distribución de su gasto cardíaco en respuesta a la hipoxia, centralizando la distribución de sangre (Wilkins, 2003). La taquicardia fetal se ha observado antes de la presentación de un aborto, parto prematuro y se ha documentado durante distocias (Bucca et al., 2005). También se ha reportado el uso de la electrocardiografía fetomaternal como una técnica confiable para detectar signos cardíacos en fetos equinos desde el día 173 de gestación y hasta el parto (Nagel, Aurich, & Aurich, 2010).

### **1.3.8 Diámetro aórtico**

El diámetro aórtico es medido en el tórax fetal, cuando esta emerge del corazón, durante la sístole, de borde a borde de la pared aórtica (Bucca et al., 2005). Una vez localizado la estructura cardíaca, se realiza la medición del diámetro aórtico lo más cercano que sea posible al corazón (Reef, Vaala, Worth, Spencer, & Hammett, 1995). El diámetro fetal aórtico está significativamente relacionado con el peso del potro, en gestaciones normales

(McKinnon et al., 2011), y este aumenta gradualmente a través de la gestación (Reef et al., 1996) con el crecimiento fetal.

### **1.3.9 Órbita Ocular fetal**

La alta prevalencia de presentación anterior de los fetos en gestaciones avanzadas hace que la orbital fetal sea de fácil acceso por medio del examen ultrasonográfico transrectal (McKinnon et al., 2011) La medición de este parámetro se puede obtener por vía transrectal y transabdominal, por la primera vía introduciendo el transductor y desplazándolo de izquierda a derecha sobre el útero, comenzando en la os cervical interna y gradualmente avanzando craneal hasta que se identifique la órbita. El transductor se posiciona sobre el ojo para lograr la imagen con mayor largo y ancho de las dimensiones del cuerpo vitreo (Turner, McDonnell, Feit, Grogan, & Foglia, 2006).

Las mediciones combinadas del largo y ancho de la órbita ocular fetal se han reportado para diferentes estadios de la gestación y demuestran una significativa relación con la edad gestacional. Desafortunadamente, la órbita ocular fetal es un indicador pobre de la edad fetal, y el tamaño de la órbita solo ofrece una estimación aproximada de la tendencia del crecimiento fetal es gestaciones avanzadas (McKinnon et al., 2011).

### **1.3.10 Espesor conjunto de la unión útero placentaria**

Áreas de engrosamientos útero placentarias y separaciones parciales de alantocorión del endometrio se pueden visualizar en el cuerpo uterino y los cuernos, utilizando ultrasonografía transabdominal, sin embargo, la porción caudal del alantocorión solo se puede visualizar vía transrectal (Troedsson, 2007). Para la imagen transrectal, el transductor es posicionado en la unión cérvico-placentaria, utilizando un transductor de 5 a 7.5 mHz. Para la obtención de la imagen transabdominal se utiliza un transductor convexo de 2 a 5 MHz (Renaudin et al., 1997). Para el cercamiento abdominal se han descrito diferentes estrategias. Renaudin en el 2000 y compañía toman un área de 10x10 del abdomen ventral y toman mediciones en zonas donde no se encuentre el feto, para evitar perjudicar la medición (Renaudin, Gillis, Tarantal, & Coleman, 2000).

### 1.3.11 Evaluación pulsos periféricos

El efecto Doppler establece que cuando una fuente de sonido emite una frecuencia de sonido constante que se mueve hacia el receptor, la frecuencia de la onda recibida aumenta y la frecuencia de la onda recibida disminuye cuando la fuente de sonido se aleja del receptor, la técnica de ultrasonido Doppler mide la velocidad de las partículas en movimiento (Tan et al., 2021).

El Doppler convencional calcula la velocidad y dirección del flujo sanguíneo, esto lo logra midiendo la frecuencia de los ecos que retornan y refiriéndolos a la frecuencia del ultrasonido emitido (MacLaren, Kluger, Prior, Royse, & Royse, 2006).

La velocimetría Doppler de los vasos fetales, útero placentarios y umbilicales se ha convertido en un método de monitoreo fetal, el cual evaluar cambios circulatorios que son reflejados en ciertas ondas Doppler fetales, las arterias umbilicales son los vasos más comúnmente evaluados, pero se ha demostrado la eficacia de evaluar también la arteria cerebral media, para con esta evaluar la perfusión intracraneana y de otros órganos y así monitorear la oxigenación fetal (Abdelwahid, Wahab, Mahmoud, Abukonna, & Saeed Taha, 2018).

El índice cerebro placentario representa la interacción en el flujo sanguíneo al cerebro, que se manifiesta por un aumento del flujo diastólico como resultado de la dilatación cerebrovascular esto debido a hipoxia y al aumento de la resistencia placentaria, dando como resultado una disminución del flujo diastólico de la arteria umbilical, cuando esto ocurre el aumento en el flujo diastólico de la arteria cerebral media muestra una disminución en la resistencia y la pulsatilidad (DeVore, 2015).

En equinos se han realizado estudios para evaluar por medio de Doppler pulsos periféricos de las arterias umbilicales y arterias uterinas, donde se evidencio un aumento del flujo sanguíneo de las arterias uterinas a medida que avanzo la gestación esto se atribuyó al aumento en la demanda de nutrientes y oxígeno por parte del feto (Stolla, Bollwein, Weber, & Wosche, 2004), por otra parte la evaluación de las arterias umbilicales fue muy difícil en lo que coinciden dos autores (McGladeery, 2016; Stolla et al., 2004).

También se ha descrito que vía transrectal se puede evaluar el pulso carotideo fetal en equinos después del día 180 de gestación, cuando el feto se encuentra en posición anterior (Bucca, Carli, & Fogarty, 2007), gracias a este acercamiento se encontró una correlación significativa de la del índice de resistencia y el índice de pulsatilidad carotideo con la edad gestacional, esto abre el espectro de investigación en equinos para la evaluación fetal (Bucca et al., 2020).

## 1.4 Pérdidas gestacionales

La presentación de un aborto o mortinato es la mayor preocupación en el último tercio de la gestación, representando una gran pérdida económica en la industria equina (Troedsson, 2007). Las condiciones que pueden ocasionar una gestación de alto riesgo pueden tener origen en la madre, el feto o la placenta (incluyendo ombligo) y además dentro de estos podemos encontrar dos grupos; las causas infecciosas y las no infecciosas (Cohen, Carey, Donahue, Seahorn, & Harrison, 2003; Donahue & Williams, 2000; Hong et al., 1993; Laugier et al., 2011; Snider, 2015).

Entre las causas de origen materno están la torsión uterina, la cual se presenta en su mayoría en gestaciones avanzadas o a término y no se ha encontrado una asociación con la edad de la yegua (Saini et al., 2013), la ruptura de la pared abdominal y el tendón prepúbico los cuales pueden afectar cualquier raza y han demostrado que con manejo médico y quirúrgico se puede obtener una cría viva (Ross, Palmer, & Wilkins, 2008). Además, la presentación de cólico en la yegua gestante que requiera cirugía se ha reportado como un factor de riesgo para la pérdida gestacional, al igual que un tiempo de anestesia mayor a 3 horas (Chenier & Whitehead, 2009).

Y por último las causas placentarias y umbilicales, dentro de las cuales las más comunes son la placentitis y la torsión del cordón umbilical (Hong et al., 1993; Laugier et al., 2011). La torsión del cordón umbilical está reflejada dentro de las causas no infecciosas más importantes por diversos autores en diferentes países, llevando a la presentación de un aborto entre los 65 y los 283 días de gestación (Agerholm et al., 2021; Hong et al., 1993; Laugier et al., 2011). Por otro lado la placentitis de origen bacteriano se reconoció como la mayor causal de pérdidas gestacionales en un estudio prospectivo en Kentucky (Hong et al., 1993), la placentitis puede ser crónica o aguda sin importar el patógeno, pero si influye

la edad gestacional al momento de la infección, se han aislado diferentes agentes entre bacterias y hongos, siendo el más común el *Streptococcus zooepidemicus* (Hong et al., 1993).

Y por último las condiciones fetales dentro de las cuales se encuentran la mal presentación del feto, las gestaciones gemelares, isoeritrolisis neonatal y malformaciones fetales (McKinnon et al., 2011).

En cuanto a la mal disposición fetal la cual describe la combinación de una presentación (anterior, posterior, transversa) posición (dorsosacral, dorsopubica, dorsoilial) y postura (cabeza y cuello, extremidades) anormales que pueden contribuir a la presentación de una distocia, la baja incidencia de presentaciones posteriores y transversas en los partos de yeguas es indicativo de la alta eficiencia del mecanismo que guía la mayoría de fetos a una presentación craneal (Frazer, Perkins, Blanchard, Orsini, & Threlfall, 1997).

La isoeritrolisis neonatal es causada por hemólisis debido a la ingestión de aloanticuerpos presentes en el calostro, los cuales destruyen los eritrocitos fetales (Abraham & Bauquier, 2021).

Las gestaciones gemelares tienen un mayor porcentaje de presentación en razas con predisposición a una doble ovulación, se estima una incidencia en la raza pura sangre inglés de 20%, en media sangre 15% y menos de un 5% en pony (Raś & Raś-Noryńska, 2021). Gracias al ultrasonido contamos con un método de compresión para la eliminación de uno de los dos gemelos y con esto prevenir la mortalidad fetal o defectos perinatales (Ginther, 2021), estudios retrospectivos concluyen que una vez es detectada la gestación gemelar la mayoría de criadores y veterinarios prefieren la reducción de uno de los embriones a permitir el parto de los dos, el cual puede comprometer la salud y futura fertilidad de la yegua (Raś & Raś-Noryńska, 2021).



## **2. Variación de las concentraciones séricas de alfa-fetoproteína en yeguas criollas colombianas durante el último tercio de la gestación**

### **2.1 Resumen**

La evaluación de la gestación por medio de biomarcadores y ultrasonografía para detectar patologías fetales y placentarias es muy importante para el diagnóstico oportuno, los objetivos de este estudio fueron determinar la variación de la concentración de Alfafetoproteína (AFP) en yeguas de grupo racial criollo colombiano en la Sabana de Bogotá durante el último tercio de la gestación y asociarla con los cambios ultrasonográficos de la placenta y feto. Se realizó un estudio prospectivo donde se utilizó una población a conveniencia de (n=21) yeguas gestantes a las cuales se les tomó muestras de sangre y se realizó un examen ultrasonográfico a partir del séptimo mes de gestación con una frecuencia mensual hasta el parto. La concentración de Alfafetoproteína fue medida por un ensayo de ELISA, y los datos obtenidos fueron analizados con medidas repetidas en el tiempo. La concentración de Alfafetoproteína mostró una diferencia estadísticamente significativa al octavo mes de gestación, en comparación con los meses 9 (P=0.050) y 10 (P=0.008) de gestación y se obtuvo un valor promedio mensual a los 7 meses:  $49.56 \pm 12,8$ , 8 meses:  $40.04 \pm 3,509$ , 9 meses:  $52,61 \pm 5.251$ , 10 meses:  $61.29 \pm 5.527$ , 11 meses:  $45.65 \pm 5.449$ . También se determinaron parámetros biométricos para la evaluación de placenta y feto. Aunque la medición de Alfafetoproteína para evaluar gestaciones en riesgo sigue siendo de carácter investigativo, se busca brindar una nueva herramienta y parámetros clínicos para la evaluación de viabilidad fetal y patologías de la placenta en el último tercio de la gestación.

Palabras claves: Alfafetoproteína, placenta, equinos, gestación, feto

**Abstract****Variation of serum concentrations of alpha-fetoprotein in Colombian Creole mares during the last third of pregnancy**

The evaluation of pregnancy by means of biomarkers and ultrasonography to detect fetal and placental pathologies is important for timely diagnosis in horses. The objectives of the study were to determine the variation of the concentration of Alpha-fetoprotein (AFP) in mares of the Colombian Creole racial group in the Bogota savanna during the last third of gestation and associate it with the ultrasound changes of the placenta and fetus. A prospective study was carried out where a population (n=21) of pregnant mares was used, from which blood samples were taken monthly starting from the seventh month of gestation until delivery. The concentration of Alphafetoprotein was measured by an ELISA assay, simultaneously blood samples, and transrectal and transabdominal ultrasonographic examination were performed, to evaluate fetal and placental parameters. These data were analyzed with repeated measurements over time. Alphafetoprotein concentration showed a tendency to increase as gestation progressed, with an average monthly value at 7 months: 47.83+ 12.8, 8 months: 41.1 + 6, 9 months: 51.3+ 6.2, 10 months: 58.7+ 9, 11 months: 50.8 + 7.2. No relationship was found between the concentration of AFP and the ultrasonographic changes of the placenta and fetus (p=0.1), the method of reproduction (p=0.13), the sex of the foal (p=0.99), the weight of the placenta (p=0.16) and the duration of gestation (p=0.2). Although the measurement of Alphafetoprotein to evaluate pregnancies at risk in horses is still of an investigative nature, it seeks to provide a new tool and clinical parameters for the evaluation of fetal viability and placental pathologies in the last third of pregnancy.

Key words: Alpha-fetoprotein, placenta, equine, gestation, fetus

## 2.2 Introducción

La necesidad de contar con herramientas diagnósticas que ayuden a identificar gestaciones en riesgo de forma temprana se ha convertido en un reto de investigación en equinos. La prevalencia constante de abortos 8-19%, la falta de eficiencia en el diagnóstico y la presentación de patologías en los primeros días de vida del neonato llevan a la necesidad de ampliar nuestro conocimiento en esta etapa de la gestación, ya que cualquier patología en el último tercio significa pérdidas económicas representativas para la industria equina (Abraham & Bauquier, 2021; Fedorka, Ball, Wynn, et al., 2021a; Galvin & Corley, 2010; Laugier et al., 2011).

Actualmente la medición de hormonas esteroidales producidas por la unidad feto placentaria a partir de los 100 días de gestación para detectar cambios en su concentración es una alternativa para evaluar gestaciones en estado tardío; pero teniendo en cuenta que en equinos los cambios endocrinológicos ocurren en una ventana muy corta de tiempo, y que el desafío es poder reconocer gestaciones en riesgo en etapas tempranas, para así poder realizar el tratamiento pertinente y mejorar la supervivencia neonatal (Canisso, Ball, Scogging, et al., 2015; Fowden et al., 2020; McKinnon et al., 2011), se han investigado marcadores adicionales extrapolados de ginecología humana dentro de los cuales está una glicoproteína fetal denominada alfa fetoproteína la cual en estudios experimentales ha demostrado tener una elevación en casos de patologías de placenta, es por esto que ha despertado particular interés para poder utilizarla dentro del plan diagnóstico de estas gestaciones en riesgo en el último tercio de gestación (Canisso, Ball, Scogging, et al., 2015; Fedorka, Ball, Wynn, et al., 2021a; Hu et al., 2019; Rizzo et al., 2019; Vincze et al., 2015).

El desarrollo de perfiles biofísicos extrapolados de ginecología humana para evaluar el crecimiento fetal se ha desarrollado en equinos y son una herramienta valiosa para identificar riesgos de enfermedad perinatal, además de ser clínicamente relevantes para diagnosticar patologías de la placenta, que pueden llevar a la presentación de un aborto después del día 100 de gestación (Becsek et al., 2019; Bucca et al., 2005; Hendriks et al., 2009; Hong et al., 1993; Renaudin et al., 1997). También se ha destacado la importancia de realizar estudios por raza, sobre todo para la evaluación de patrones de crecimiento, los cuales han demostrado una diferencia significativa entre razas de tamaño similar (Hartwig et al., 2013; Razquin-Echeverriarza et al., 2019; Turner et al., 2006).

Teniendo en cuenta la dificultad de estos diagnósticos en Colombia, y el alto valor económico con la implementación de nuevas técnicas reproductivas entre ellas la clonación, donde con ayuda de la ultrasonografía desde los 90 días de gestación se han diagnosticado anomalías placentarias tales como edema patológico de la placenta, aumento del grosor útero placentario, engrosamiento del cordón umbilical, edema umbilical así como también dilatación del uraco lo cual permite realizar tratamientos a tiempo en estas gestaciones de clones (Pozor et al., 2016) y también la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) la cual reporta un 15% de pérdidas entre la primera semana después de la transferencia y la primera semana después del parto, a pesar de esto el seguimiento ultrasonográfico de las receptoras juega un rol importante debido al alto costo de la técnica y de las crías (Claes & Stout, 2022; Maserati & Mutto, 2016). Es por estas razones que se hace necesaria la investigación de más técnicas diagnósticas que aumenten las herramientas con las que el médico veterinario cuente para determinar la viabilidad de la gestación con el fin de tener parámetros para evaluar el riesgo de aborto en gestaciones en riesgo.

El objetivo del estudio fue estudiar la variación de la concentración de Alfa-fetoproteína (AFP) equina en yeguas de grupo racial criollo colombiano en la Sabana de Bogotá durante el último tercio de la gestación, para determinar los valores normales de Alfa-fetoproteína en yeguas de grupo racial criollo colombiano entre los 7-11 meses de gestación, en yeguas de grupo racial criollo colombiano y estimar su variación con los cambios ultrasonográficos de placenta y feto, el sexo de la cría y el método de reproducción.

## **2.3 Materiales y métodos**

### **2.3.1 Metodología del estudio**

Todos los procedimientos fueron completados de acuerdo con el comité de ética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia bajo las directrices del protocolo aprobado # 068-19. El estudio se llevó a cabo en el departamento de Cundinamarca en la sabana de Bogotá, a una altura promedio de 2.600 msnm, un sistema bimodal de lluvias y una temperatura promedio de 13.5 - 15°C.

Para el desarrollo del estudio se incluyeron veintiún yeguas pertenecientes al grupo racial criollo colombiano, a partir del séptimo mes de gestación. La edad promedio de las yeguas fue 6.7

( $\pm 2.19$  desviación estándar [DE]) y un peso promedio de 366 kg ( $\pm 44.9$ ). De estas yeguas, 9 fueron receptoras resultado de transferencia embrionaria y 12 gestaron hijos propios. Las yeguas se examinaron en un brete sin sedación donde se obtuvo una muestra de sangre además se realizó la evaluación por medio de ultrasonografía vía transrectal y transabdominal con un intervalo de 30 días, entre los 180 días y hasta los 340 días de gestación, la duración de la gestación tuvo un promedio de 331 días ( $\pm 2.35$ ).

### **2.3.2 Medición Alfafetoproteína**

Las muestras de sangre fueron tomadas cada 30 días a partir del día 180 de gestación y hasta el día del parto, a cada una de las yeguas incluidas en el estudio, la muestra fue tomada de la vena yugular de la yegua gestante, utilizando una aguja vacutainer® N°21, colectada en un tubo sin anticoagulante de 10ml. La sangre fue refrigerada y transportada hasta el laboratorio de posgrados de la Universidad Nacional, donde se centrifugó a 1.000g por 20 minutos a 5°C, y el suero se congeló a -80 °C hasta su análisis (Vincze et al., 2015). La concentración de Alfafetoproteína fue medida por un ensayo comercial de ELISA, para AFP especie: *Equus caballus*; USBiologycal®. El rango de detección de la prueba es de 6.25 – 400pg/ml, donde la sensibilidad de la prueba se establece como la dosis mínima detectable de Alfafetoproteína (2,54 pg/ml). El coeficiente de variación e intraensayo de 7.8%. No se reporta una reacción cruzada o interferencia significativa entre la Alfafetoproteína y sus análogos (USBiologycal®, 2020).

### **2.3.3 Parámetros ultrasonográficos**

La evaluación del feto incluyó las mediciones de la frecuencia cardíaca fetal, el diámetro aórtico fetal, la órbita fetal y para evaluación de la placenta, los grosores uteroplacentarios a nivel transrectal (GUPR) y transabdominal (GUPA). Todos los ultrasonidos fueron realizados por el mismo médico veterinario, las imágenes fueron obtenidas con un Sonoscape® S2, equipado con una sonda lineal transrectal (5 - 7.5 MHz) y una sonda convexa para evaluación transabdominal (2 - 5 MHz). Inicialmente se realizó la evaluación transabdominal y posteriormente la transrectal.

- **Espesor conjunto unión útero placentaria transabdominal**

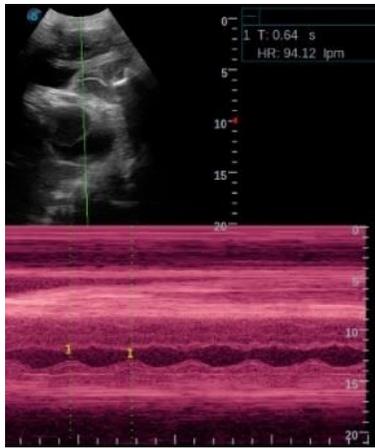
En la evaluación transabdominal se evaluó en conjunto la unión útero placentaria, dividiendo el abdomen en seis cuadrantes, desde el xifoideas hasta craneal a la glándula mamaria, y al lado izquierdo y derecho de la línea media. Los cuadrantes son caudal derecho e izquierdo, medio derecho e izquierdo y craneal derecho e izquierdo. De cada cuadrante se obtuvo una imagen del grosor útero placentario a una profundidad de 5 a 10 cm, y se tomaron tres mediciones de cada cuadrante para obtener un promedio (Figura 2-1) y finalmente el promedio de todo el abdomen (Bucca et al., 2005; Renaudin et al., 2000; Vincze et al., 2019).



**Figura 2-1:** Medición del espesor conjunto de la unión útero placentaria transabdominal en yeguas de grupo racial criollo colombiano con 11 meses de gestación.

#### ▪ Frecuencia Cardíaca fetal

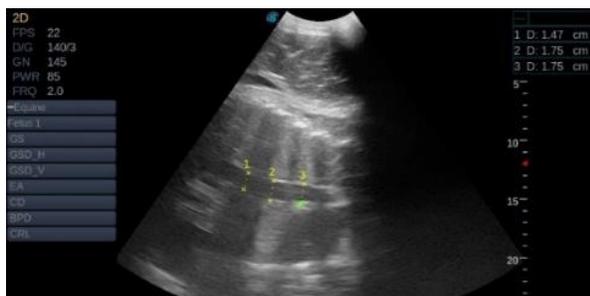
La frecuencia cardíaca fue medida vía transabdominal, se localizó el arco costal y se buscaron las estructuras cardíacas en modo B del ultrasonido y utilizando el modo M del ecógrafo y el software de frecuencia cardíaca incluido en este (Curran & Ginther, 1995). Se realizaron 3 medidas para obtener un promedio (Figura 2-2).



**Figura 2-2.** Ecocardiografía fetal en yegua de 9 meses de gestación del grupo racial criollo colombiano, vía transabdominal utilizando transductor convexo de 2-3.5 Mhz en modo B y M.

- **Diámetro fetal aórtico**

Caudal al corazón en la fase sistólica se obtuvo la imagen de la aorta fetal, una vez se identificó la imagen, esta se congeló y se realizaron tres mediciones lo más cercano al corazón (figura 2-3) para obtener un promedio (Renaudin et al., 2000).



**Figura 2-3.** Ultrasonido transabdominal en yegua de grupo racial criollo colombiano, con 9 meses de gestación, donde se ubica la arteria aorta abdominal fetal y se realizan tres mediciones.

- **Órbita fetal**

Vía transrectal se introdujo el transductor craneal al cérvix, sobre el útero y se desplazó de izquierda a derecha hasta identificar el cráneo y la órbita fetal. Se identificaron estructuras tales como córnea, cristalino, cámara anterior y cámara posterior, se realizó la medición a lo largo y ancho (figura 2-4) y esto se suma para obtener el valor (Hartwig et al., 2013).



**Figura 2-4.** Medición de ancho y largo de la órbita fetal.

- **Espesor conjunto de la unión útero placenta vía transrectal**

Se posicionó el transductor craneal a la estrella cervical, teniendo como referencia la porción más caudal del útero, la arteria uterina media en la parte caudal y el líquido alantoico en la porción craneal (figura 2-5); se realizaron tres mediciones en la parte ventral para obtener un promedio (Renaudin et al., 1997).



**Figura 2-5.** Medición del espesor conjunto de la unión útero placentaria en yegua con 8 meses de gestación.

### **2.3.4 Evaluación de la placenta**

Al momento del parto, inmediatamente después de la expulsión de la placenta se tomó el peso, con una pesa convencional para pesar las membranas fetales, y por último se posicionó en forma de F y se tomaron muestras para; histopatología de la estrellita cervical, el cuerpo de la placenta, el cuerno gestante y del cuerno no gestante para futuros estudios (Hong et al., 1993).

### **2.3.5 Evaluación del neonato**

Se registró la supervivencia del potro al parto, se evaluó la duración de la gestación, el tipo de parto (eutócico o distócico) y la supervivencia de este por un mes.

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos por ultrasonido y los resultados de la concentración de AFP se almacenaron y se realizó estadística descriptiva; se determinó la media, error estándar, valores mínimos, máximos y los rangos en cada mes de gestación. Se probó el supuesto de normalidad con una prueba (Shapiro Wilk). Se realizaron medidas repetidas en el tiempo (GLM), para el análisis de varianza de los valores de AFP y ultrasonográficos de feto y placenta de cada yegua en los 5 meses de monitoreo y con esto, probar el supuesto de homocedasticidad de la varianza. Se realizó una prueba post hoc de Tukey y los valores menores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos. También se realizó ANOVA de una y dos vías para la interacción entre variables. Para la concentración de alfafetoproteína y los parámetros de viabilidad fetal placentaria se realizó una regresión lineal y se determinó la asociación entre ellas por medio del coeficiente de correlación de Spearman. Las variables fueron evaluadas con el paquete estadístico SPSS® versión 9.1 para Windows®.

## 2.4 Resultados

### 2.4.1 Información clínica

De las 21 yeguas incluidas en el estudio, 19 llevaron su gestación a término y sin complicaciones. A 12 de estas yeguas se les realizó inseminación artificial y a 8 se les realizó transferencia embrionaria. La edad gestacional promedio fue 331 días ( $\pm 11$ ), nacieron 7 machos y 14 hembras. Las placentas de todas las yeguas fueron pesadas dentro de las primeras 6 horas después del parto, el peso promedio de las placentas fue de 3.003 gramos ( $\pm 663$ ). A los neonatos se les realizó un examen físico al momento del parto y se les hizo seguimiento por un mes para corroborar su viabilidad.

### 2.4.2 Evaluación parámetros ultrasonográficos

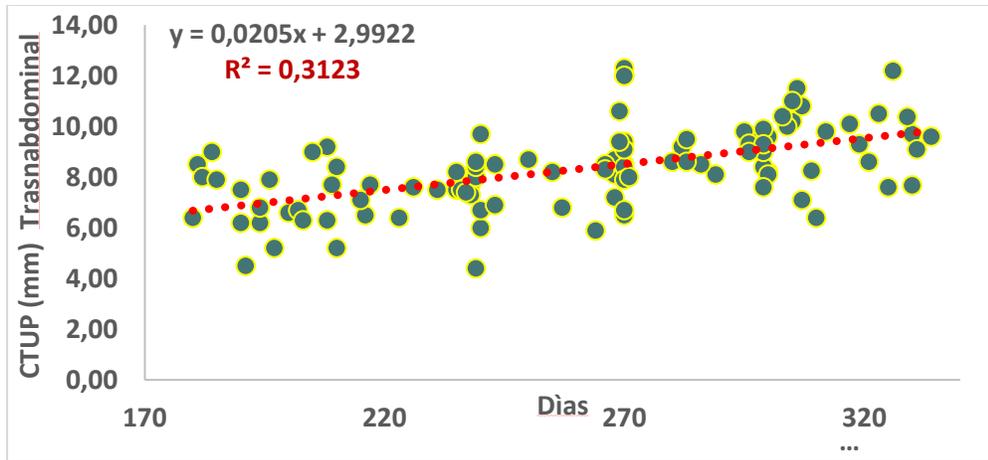
Los parámetros ultrasonográficos de feto y placenta fueron evaluados mensualmente a partir del séptimo mes de gestación y hasta el parto. Los promedios de estos parámetros se enlistan en la tabla 2-1.

	Mes 7	Mes 8	Mes 9	Mes 10	Mes 11
Frecuencia cardiaca (lat/min)	114 $\pm$ 2.54 <sup>a</sup>	106 $\pm$ 2.06 <sup>ab</sup>	100 $\pm$ 1.95 <sup>b</sup>	97 $\pm$ 1.93 <sup>c</sup>	92 $\pm$ 1.83 <sup>c</sup>
Aorta (mm)	10.6 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	11.6 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	15.2 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	17.1 $\pm$ 0.9 <sup>c</sup>	19.3 $\pm$ 0.7 <sup>d</sup>
Órbita ocular (mm)	44.5 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	50.0 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	54.2 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup>	57.6 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup>	59 $\pm$ 1 <sup>d</sup>
GUP abdominal (mm)	7.0 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	7.4 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	8.4 $\pm$ 0.4 <sup>ab</sup>	9.0 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	9.6 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
GUP transrectal (mm)	6.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	6.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	7.5 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	9.2 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	9.8 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>

**Tabla 2-1:** parámetros de evaluación de viabilidad fetal y placentaria, promedios y error estándar.

- **Grosor útero placentario transabdominal**

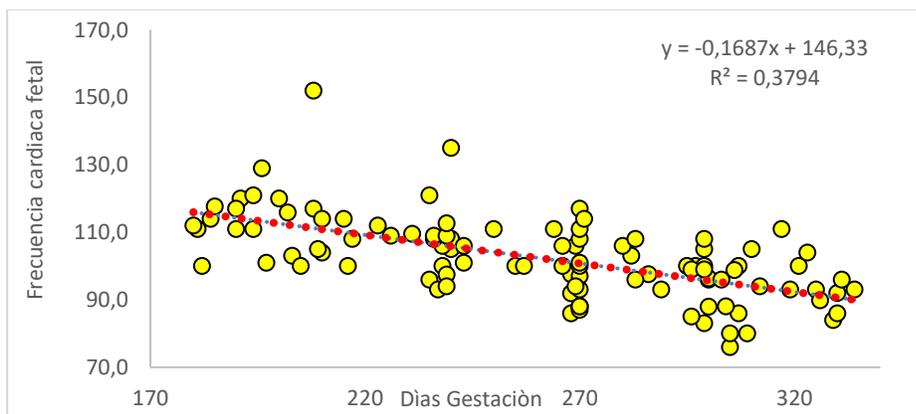
Se observa gran variación en los mínimos y máximos, pero se observa un aumento a medida que avanza la gestación, se reportan promedios al mes 7 (7mm $\pm$ 0.3mm) mes 8 (7.4mm  $\pm$ 0.3mm), mes 9 (8.4mm  $\pm$  0.4mm), mes 10 (9mm  $\pm$  0.3mm), mes 11 (9.6mm  $\pm$ 0,4mm) y se encuentran diferencias estadísticamente significativas a partir del 10 mes de gestación en relación con el mes 7 (P=0.01), 8 (P=0.05) y el mes 11 con el mes 7 (P=0.02), mes 8 (P=0.025). no se evidenció una relación del grosor útero placentario con la edad gestacional ( $R^2 = 0,3$ ;  $y = 0,020X+2,992$ ).



**Figura 2-6:** regresión lineal del grosor útero placentario transabdominal (mm) y los días de gestación

- **Frecuencia Cardiaca Fetal**

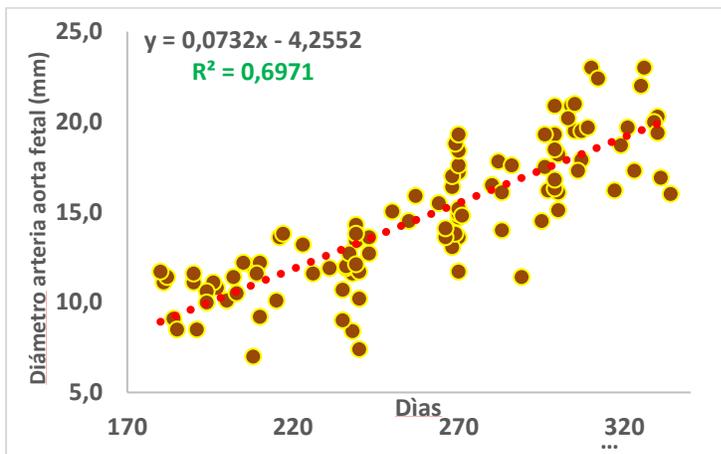
Se reporta el promedio mensual, de la frecuencia cardiaca. En los resultados se obtuvo un mínimo de 76 latidos / minuto y un máximo de 152 latidos/minuto (tabla 2-2). Se observó una disminución a medida que avanza la gestación con promedios al mes 7 ( $114 \pm 2.3$ ), mes 8 ( $106 \pm 2,9$ ), mes 9 ( $100 \pm 2.96$ ), mes 10 ( $97 \pm 0.9$ ) y mes 11 ( $92 \pm 1.4$ ) y diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre el mes 7 con relación a los meses 9 ( $P = 0.021$ ), 10 ( $P = 0.001$ ) y 11 ( $P = 0.006$ ) y entre el mes 8 y 11 ( $P = 0.009$ ). La frecuencia cardiaca fetal no presentó relación con la edad gestacional ( $R^2 = 0,379$ ;  $y = 0,168X + 146,3$ ).



**Figura 2-7:** R lineal de la frecuencia cardiaca (lat/min) y la duración de la gestación, entre el mes 7 y 11 de gestación (n=21).

- **Diámetro Aórtico**

La media del diámetro fetal aórtico presentó un aumento a medida que avanzó la gestación, teniendo un promedio al mes 7 ( $10.6\text{mm} \pm 0.6\text{mm}$ ), mes 8 ( $11.6\text{mm} \pm 0.6\text{mm}$ ), mes 9 ( $15.2\text{mm} \pm 0.6\text{mm}$ ), mes 10 ( $17.1\text{mm} \pm 0.9\text{mm}$ ) y mes 11 ( $19.3\text{mm} \pm 0.7\text{mm}$ ) de gestación (tabla 2-1). Se reportan diferencias estadísticamente significativas de los meses 7 con los meses 9 ( $P=0.001$ ), 10 ( $P=0.000$ ) y 11 ( $P=0.000$ ), entre el mes 8 y el mes 9 ( $P=0.011$ ), 10 ( $P=0.000$ ) y mes 11 ( $P=0.000$ ) y en el mes 9 con el mes 10 ( $P=0.03$ ) y 11 ( $P=0.006$ ). El diámetro de la aorta fetal presentó una asociación moderada con los días de gestación ( $R^2 = 0,697$ ;  $y = 0,073 X - 4,255$ ).

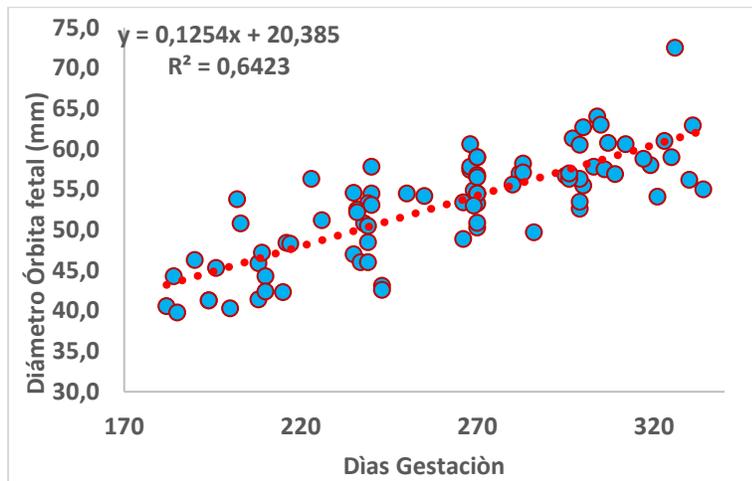


**Figura 2-8:** R lineal del diámetro de la aorta fetal (mm) y los días de gestación entre el día 180 y el 330 de gestación.

- **Órbita fetal**

Se reportaron los promedios por mes a partir del séptimo mes ( $44.5\text{mm} \pm 1.9$ ), octavo mes ( $50\text{mm} \pm 1.8\text{mm}$ ), noveno mes ( $54.2\text{mm} \pm 1,2\text{mm}$ ), decimo mes ( $57.6\text{mm} \pm 1.2$ ), undecimo mes

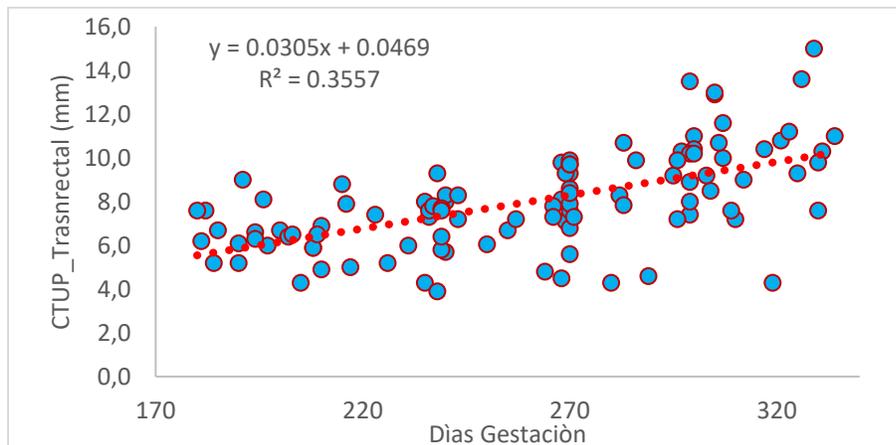
( $59\text{mm} \pm 1$ ). También diferencias estadísticamente significativas entre el mes 7 con los meses 8 ( $P=0.041$ ), 9 ( $P=0.005$ ), 10 ( $P=0.001$ ) y 11 ( $P=0.001$ ), el octavo mes con los meses 10 ( $P=0.004$ ) y 11 ( $P=0.001$ ), el noveno mes con el mes 11 ( $P=0.05$ ) (tabla 2-1). El diámetro ocular fetal presentó una relación lineal positiva y una moderada relación con la edad gestacional ( $R^2 = 0,6423$ ;  $y = 0,125X + 20,38$ ).



**Figura 2-9:** regresión lineal del diámetro del globo ocular (mm) y los días de gestación en los últimos 5 meses de gestación.

### Grosor útero placentario transrectal

Se observó un aumento de los promedios a medida que avanzó la gestación, teniendo gran variación en los valores, se reportan promedios al mes 7 ( $6,5\text{mm} \pm 0,3$ ), mes 8 ( $6,7\text{mm} \pm 0,3$ ) mes 9 ( $7,5\text{mm} \pm 0,5$ ), mes 10 ( $9,2\text{mm} \pm 0,4$ ) y mes 11 ( $9,8\text{mm} \pm 0,5$ ). (tabla 2-2). Se observaron diferencias estadísticamente significativas de los meses 7 y 8 de gestación en comparación con los meses 9 ( $P=0.003$ ,  $0.015$ ), 10 ( $P=0.003$ ,  $0,001$ ) y 11 ( $P=0.005$ ,  $0.01$ ) respectivamente. La medición del grosor útero placentario transrectal no evidenció asociación con la edad gestacional ( $R^2 = 0,35$ ;  $Y = 0,0305X + 0,046$ ).



**Figura 2-10:** Regresión lineal del grosor útero placentario transrectal (mm) y los días de gestación.

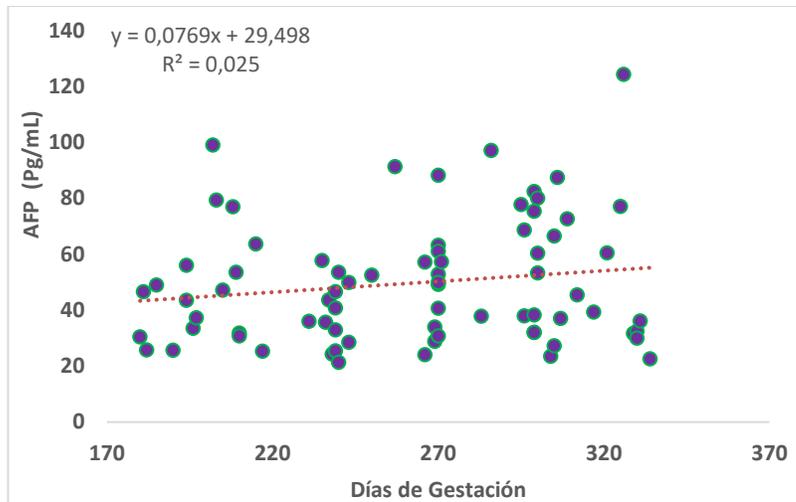
### 2.4.3 Medición sérica Alfafetoproteína

Al evaluar la concentración de alfa fetoproteína en suero de yeguas del grupo racial criollo colombiano en los cinco últimos meses de gestación se encontró un promedio mensual de: al mes 7:  $49.56 \pm 5.832$  pg/mL, mese 8:  $40.04 \pm 3.509$  pg/mL, mes 9:  $52.61 \pm 5.251$  pg/mL, mes 10:  $61.29 \pm 5.527$  pg/mL, mes 11:  $45.65 \pm 5.449$  pg/mL (tabla 2-2).

Mes	Promedio	± Error Estandar	IC 95%	
			Min	Max
7	49.56 <sup>ab</sup>	5.832	36.96	62.16
8	40.04 <sup>a</sup>	3.509	32.46	47.62
9	52.61 <sup>b</sup>	5.251	41.26	63.95
10	61.29 <sup>b</sup>	5.527	49.35	73.23
11	45.65 <sup>ab</sup>	5.449	33.88	57.42

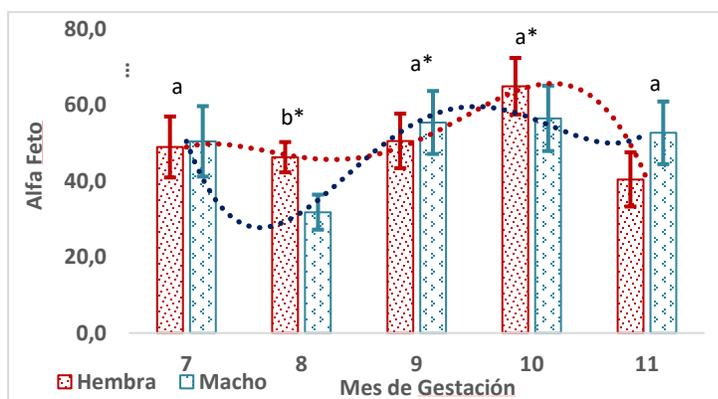
**Tabla 2-2:** Promedios de la concentración mensual de AFP (pg/mL), error estándar, mínimos y máximos en yeguas de grupo racial criollo colombiano durante los meses 7 y 11 de gestación.

Se observó una disminución significativa al octavo mes contra el mes 9 ( $p=0.035$ ) y mes 10 ( $p=0.01$ ) y valores variables mes a mes. Al realizar la regresión lineal no existe una asociación con la edad gestacional ( $R^2= 0,025$ ;  $y=0,0769X + 29,498$ ).



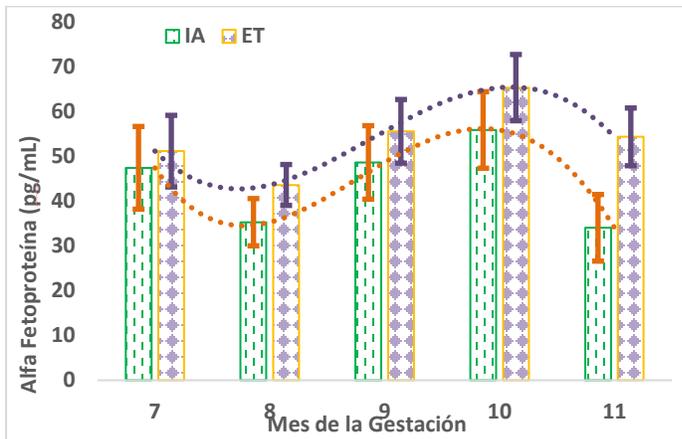
**Figura 2-11:** regresión lineal de la concentración mensual de AFP (pg/mL) en yeguas de grupo racial criollo colombiano durante los meses 7 y 11 de gestación,  $r=0.025$ .

Al evaluar el efecto del sexo del potro en la concentración de alfafetoproteína se encontró una relación estadísticamente significativa en el octavo mes de gestación entre los dos sexos ( $P=0.025$ ), y entre el mes ocho y once en la concentración de alfafetoproteína entre sexos ( $P<0.05$ ). (figura 2-12).



**Figura 2-12:** Diferencias en la concentración sérica de AFP (pg/mL) durante el mes 7-11 de la gestación en yeguas de grupo racial criollo colombiano de acuerdo con el sexo de la cría.

En cuanto al efecto de la técnica de reproducción y el nivel de AFP no se encontró una relación estadísticamente significativa entre las yeguas producto de transferencia embrionaria y las yeguas en las que se realizó inseminación artificial, pero se observa una mayor concentración en las yeguas receptoras con gestaciones producto de transferencia embrionaria (figura 2.13).



**Figura 2-13:** relación en la concentración sérica materna de AFP (pg/mL) de acuerdo con el método de reproducción en los últimos cinco meses de gestación.

## 2.5 Discusión

La necesidad de avanzar en el diagnóstico prematuro de patologías del feto y placenta en el último tercio de gestación en yeguas ha abierto un campo de investigación en años recientes donde la búsqueda de biomarcadores podría ser una respuesta a los interrogantes que aún existen en esta área (Canisso, Ball, Scogging, et al., 2015; Canisso et al., 2020) .

La Alfafetoproteína ha estado ligada como marcador de patologías del feto y placenta en humanos, para sustentar el porqué de la medición de Alfafetoproteína como marcador de patologías placentarias se tienen hoy en día algunos reportes experimentales donde se ha reconocido su aumento en suero materno de ratonas gestantes tratadas con lipopolisacáridos, los cuales son los responsables de ocasionar inflamación de la placenta (Girard et al., 2022) por lo tanto llevan a la presentación de partos prematuros, mortinatos y restricción fetal del crecimiento más estudiado en humanos (Hu et al., 2019).

Cabe destacar que en equinos hay pocos estudios que evalúen la concentración materna de AFP y su relación con patologías del feto y placenta (Canisso, Ball, Scogging, et al., 2015; Vincze et al., 2015). En este reporte se evidenció una diferencia estadística entre el octavo mes y el noveno mes ( $P=0.05$ ), y entre el octavo y el décimo mes de gestación ( $P=0.008$ ), además concentraciones variables entre los mínimos y máximos en los mismos meses de gestación, contrario a lo reportado por Vincze 2015 quien reporta una disminución en la concentración de Alfafetoproteína después de los 4 meses de gestación y hasta el parto; pero si reporta una gran variación en la medición entre yeguas en los mismos meses de gestación (Vincze et al., 2015). Fedorka reportó en el 2021 que la concentración de Alfafetoproteína en un grupo de yeguas control permaneció estable durante el último mes de gestación de toma de muestras, cuando se tomó semanalmente (Fedorka, Ball, Wynn, et al., 2021a). Adicionalmente, Bucca en el 2020 reportó que no había relación entre la concentración de AFP y los meses gestación de yeguas evaluadas entre los 4 meses de gestación y hasta el parto (Bucca et al., 2020).

No se encontró relación entre la concentración de AFP y la edad gestacional de la yegua, contrario a lo reportado por Vincze, quien describe una disminución en la concentración a mayor edad de la yegua (Vincze et al., 2015), pero este hallazgo de la edad de la yegua no ha sido reportado por otros autores.

En cuanto a la yegua que presentó distocia, está mantuvo niveles altos de Alfafetoproteína entre los meses 7 y 10 de gestación y una disminución en el último mes antes del parto, no existen reportes donde se evalúe la concentración de Alfafetoproteína en casos de distocia en equinos pero estudios realizados en medicina humana han concluido que la medición de Alfafetoproteína es un marcador útil de disfunción placentaria y está asociada con el desarrollo de enfermedad isquémica de la placenta, restricción del crecimiento fetal, la presentación de partos prematuros, bajo peso del neonato y malformaciones genéticas (Bartkute et al., 2017; Dinglas et al., 2020; Gaccioli et al., 2017), pero no se encontraron estudios que relacionaran su concentración en casos de distocias.

Dentro de las yeguas del estudio, tres de ellas presentaron aumento del grosor útero placentario al examen ultrasonográfico transrectal, pero su gestación llegó a término y parieron un potro vivo y saludable. Este aumento del grosor puede deberse a la posición del feto y a la dinámica de fluidos fetales en el momento del examen (Bucca et al., 2005).

Se buscaba evaluar el efecto del tipo de parto (eutócico o distócico) y de la sobrevivencia neonatal con la concentración sérica de AFP, pero debido a la baja cantidad de casos (1 distocia y un parto prematuro con un potro no viable) las comparaciones son limitadas y sería necesario un mayor tamaño de muestra para evaluarlo.

En este estudio se evaluó si la concentración de AFP estaba influenciada por los parámetros de viabilidad fetal y placentaria valorados por medio de ultrasonido, pero no se encontró relación entre la concentración sérica de AFP y los parámetros ultrasonográficos, entre ellos la frecuencia cardíaca ( $R^2= 0.0092$ ;  $y=-0.584x + 33.22$ ), el diámetro de la aorta fetal ( $R^2= 0.0042$ ;  $y=0.3365x + 43.638$ ), el grosor útero placentario transrectal ( $R^2= 0.0112$ ;  $y=1.003x + 40.3$ ), el grosor útero placentario transabdominal ( $R^2= 0.0018$ ;  $y=-0.584x + 53.46$ ); a pesar de esto, estudios realizados en humanos han demostrado la importancia de la combinación de técnicas donde se evalúen marcadores como AFP junto con el uso de ultrasonografía para el diagnóstico prematuro de patologías en el feto como síndrome de Down y espina bífida (De Lange et al., 2009; Wald & Bestwick, 2016; Witters, Coumans, Gyselaers, 2013). Es importante también tener en cuenta que las yeguas incluidas en el estudio fueron consideradas sanas.

Con relación al peso de la placenta no se detectó una relación con la concentración de AFP, esto puede deberse a que se ha demostrado que la AFP no es sintetizada por la placenta en el último tercio de gestación (Newby et al., 2005), y su aumento corresponde a un aumento en la permeabilidad de la placenta.

En cuanto al método de reproducción no se encontró una asociación o una diferencia entre la inseminación artificial y la transferencia embrionaria con la concentración del biomarcador ( $p=0.13$ ), esto también fue reportado por Bucca en 2020 quien realizó la medición en 12 yeguas de las cuales tres eran receptoras y no se encontró una asociación (Bucca et al., 2020). En el presente estudio se observó una concentración mayor de alfafetoproteína en las yeguas receptoras producto de transferencia embrionaria; desafortunadamente no hay reportado en equinos estudios con este hallazgo. En humanos una elevada concentración de AFP se ha asociado con un mayor riesgo de presentación de casos de enfermedad isquémica de la placenta y restricción del crecimiento fetal (OR, 2.26, 95% IC) (Dinglas et al., 2020).

Por otro lado, el sexo del potro también fue evaluado y se encontró una diferencia significativa entre sexos en el octavo mes de gestación ( $P=0.035$ ) y una diferencia en la concentración de

AFP con el efecto sexo cría entre el mes ocho y once de gestación (0.042). Respecto a la relación sexo y alfafetoproteína se ha estudiado en humanos que los machos presentaron una mayor concentración de AFP (Chen et al., 1994), uno de los primeros estudios en humanos que evaluó el efecto sexo y la concentración de AFP en mujeres de un grupo control y un grupo con compromiso de la gestación reportó un aumento en suero materno de AFP en madres con fetos masculinos (Bremme & Eneroth, 1983). En equinos Vincze en el 2015 reportó en yeguas de raza Lipizzana que ni el sexo del potro, ni su peso al nacimiento tenían relación con la concentración de AFP (Vincze et al., 2015).

La duración de la gestación no afectó la concentración de AFP ( $p=0.2$ ), En humanos se pueden encontrar resultados contradictorios donde la evaluación de alfafetoproteína no se han asociado con partos prematuros (Gaccioli et al., 2017), pero si se ha asociado su elevación con un aumento en el riesgo de partos prematuros espontáneos en mujeres, esto se asoció a una disfunción placentaria (Gammill et al., 2003).

Hasta el momento este es el primer estudio que se realiza en yeguas de grupo racial criollo colombiano en el que se mide la concentración sérica de Alfafetoproteína en yeguas gestantes en el último tercio de gestación.

La evaluación ultrasonográfica de las yeguas en el último tercio de gestación es una herramienta que se ha desarrollado en los últimos años y que brinda información valiosa sobre el estado del feto y la placenta, basándonos en la medición de variables de crecimiento. En Colombia solo se ha realizado un estudio previo a una menor altura sobre el nivel del mar (1280 msnm) evaluando estas variables, menos la órbita ocular fetal (Vega, 2013).

Respecto a los parámetros ultrasonográficos utilizados para evaluar al feto se realizó la medición de la frecuencia cardiaca puesto que se ha descrito que existe un aumento de la presión sanguínea a medida que avanza la gestación, asociada con la disminución en la frecuencia cardiaca, las cuales están acompañadas con un aumento en las concentraciones fetales de hormonas vasoactivas entre ellas adrenalina, noradrenalina y vasopresina esto para aumentar los requerimientos nutricionales y de oxígeno del feto a medida que aumenta su tamaño, en gestaciones normales (Forhead et al., 2000; Fowden et al., 2020). La disminución de la frecuencia cardiaca fetal se ha estudiado en ovinos y se concluyó que el sistema nervioso autónomo regula esta disminución, debido al aumento progresivo de la actividad parasimpaticomimética en contraste con la actividad simpática (41–43).

Diversos estudios han reportado una disminución de la frecuencia cardíaca a medida que avanzó la gestación, relación encontrada en diversas razas y especies (Breukelman et al., 2006; Curcio et al., 2017; Incze et al., 2015; Nagel et al., 2011). La evaluación de la frecuencia cardíaca puede utilizarse para realizar seguimiento en gestaciones normales y también para diagnosticar gestaciones en riesgo, puesto que la presentación de bradicardia se ha asociado con muerte fetal y pronóstico negativo del neonato y la taquicardia con distocia, aborto o parto prematuro (12,47–49).

En cuanto a los parámetros para evaluar desarrollo fetal se utilizó la medición del diámetro aórtico fetal, el cual se puede evaluar desde el día 100 de gestación y hasta el parto, tiene una fuerte relación con los días de gestación, también se ha relacionado con el peso del potro al nacimiento y un valor bajo con gestaciones en riesgo (Reef et al., 1995; Renaudin et al., 2000). Se ha encontrado que los equinos exhiben una tendencia similar a lo encontrado en humanos en los cuales hay una relación edad – diámetro ya que tanto el grosor como el diámetro luminal aumentan con la edad (Endoh et al., 2017) y sustentaría lo estudiado en este parámetro donde se ha encontrado un aumento a medida que avanza la gestación.

La relación entre el diámetro aórtico y el tamaño del feto puede ayudar a detectar problemas en el crecimiento normal del feto, esto debido a falla en la placentación y en el intercambio de nutrientes (Bucca et al., 2005). El diámetro promedio que se ha dado por diferentes autores para razas grandes, como pura sangre de carreras o media sangre son mayores que las obtenidas en este estudio, pero al comparar los resultados con estudios realizados en el grupo racial criollo colombiano, reportaron un mínimo de 10.3mm al séptimo mes de gestación y un máximo de 19.8 al mes 11 de gestación (Vega, 2012). Vega en 2012 también reportó diferencias estadísticamente significativas en todos los meses de gestación evaluados, resultado no encontrado en este estudio donde solo se encontró diferencias estadísticamente significativas de los meses siete y ocho en comparación con los 3 últimos meses de gestación y entre los tres últimos meses de gestación, esto debido a que el feto equino gana el 75% de su peso en la última etapa de la gestación (Fowden et al., 2020; Platt, 1978).

A diferencia de Hendricks y colaboradores quienes encontraron una relación en el diámetro aórtico fetal y la edad de la yegua con un n de 30 yeguas preñadas de raza media sangre alemana, en este estudio no se encontró relación con la edad de la yegua, a pesar de tener un rango de edad más amplio que el estudio realizado por los otros autores mencionados, pero

teniendo un número menor de yeguas en el estudio lo cual puede influir en la relación encontrada por ellos.

Otro parámetro utilizado en equinos para evaluar el desarrollo fetal es la órbita ocular fetal, el cual tiene un fácil acceso por medio del examen ultrasonográfico transrectal debido a la alta prevalencia de presentación obstétrica anterior de los fetos en gestaciones avanzadas (McKinnon et al., 2011). Se observó un aumento en el diámetro de la órbita fetal a medida que avanza la gestación, otros autores han reportado modelos de crecimiento curvilíneos a la medición del largo de la órbita fetal (Turner et al., 2006), y modelos de crecimiento lineal en raza criolla de Brasil (Hartwig et al., 2013) y en Standardbred (Lanci et al., 2019). Estos autores han concluido que este tipo de estudios deben ser realizados en cada grupo racial, por que los tamaños oculares pueden ser diferentes y no están relacionados con el tamaño del equino (Turner et al., 2006). El tamaño de la órbita fetal se ha considerado como un estimador poco sensible de la edad fetal, y se ha reportado una diferencia significativa en los patrones de crecimiento existentes entre diferentes razas equinas, de tamaño similar (McKinnon et al., 2011; Razquin-Echeverriarza et al., 2019), sin embargo, se ha encontrado una relación entre el tamaño de la órbita fetal y la edad gestacional, ya que esta aumenta a medida que la gestación avanza y ofrece una aproximación estimada de la tendencia de crecimiento fetal (Bucca et al., 2005).

Es importante tener en cuenta que la forma de la órbita fetal cambia a medida que avanza la gestación de una forma globular a una convexa, algunos autores han descrito como mejor predictor el largo de la órbita fetal, pero también la medición de los dos diámetros ha servido como predictor de parto (Lanci et al., 2019; Murase et al., 2014). Autores como Lanci y Hendriks han reportado que no hay influencia de la edad y el número de partos de la yegua en el diámetro, desafortunadamente en este estudio no se pudo obtener esa información de todas las yeguas incluidas en el estudio debido a que no se tenía historia clínica ni reproductiva de las receptoras (Hendriks et al., 2009; Lanci et al., 2019).

Además de la evaluación del feto y su desarrollo, la evaluación por ultrasonido del grosor de la unión útero placentaria ha demostrado ser clínicamente relevante para diagnosticar patologías de la placenta (McKinnon et al., 2011; Renaudin et al., 1997). Al evaluar el grosor útero placentario, estos valores aumentaron con la edad gestacional, lo cual ha sido reportado en otras razas (Bucca et al., 2005; Campos et al., 2017; Kimura et al., 2018; Morris et al., 2007; Renaudin et al., 1997; Souza et al., 2010), este aumento a medida que avanza la gestación se ha

relacionado con un incremento en la vascularización en respuesta al crecimiento fetal, para suplir sus necesidades (Bucca et al., 2005; Requena et al., 2017).

En cuanto a la medición del grosor útero placentario transrectal, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en este parámetro a partir del noveno mes de gestación en comparación con los meses 7 y 8 ( $P=0.003$ ,  $0.015$ ), diferencia también reportada por Renaudin, quien reportó no cambios significativos hasta el octavo mes de gestación y un aumento significativo cada mes entre los meses 10 y 12 ( $P<0.001$ ) pero no por otros autores con estudios en razas criollas, donde se reportó un aumento significativo a partir del octavo mes de gestación (Campos et al., 2017; Souza et al., 2010), pero se debe considerar que autores como Souza solo reportaron el valor más alto de tres mediciones realizadas y no el promedio de las tres mediciones como se realizó en este estudio.

Al realizar la medición del grosor útero placentario a nivel de la estrella cervical se obtienen resultados variables entre los meses de gestación de la misma yegua evaluada; acontecimiento reportado también por Kimura en yeguas de tiro pesado japoneses y por Bucca en yeguas pura sangre inglés que reportan gran variabilidad entre los valores, esto atribuido a factores como la dinámica de fluidos, la posición fetal y la dificultad de medir la misma área (Bucca et al., 2005; Kimura et al., 2018). No se reporta un efecto de la edad de las yeguas o el peso de las yeguas sobre el grosor útero placentario, al igual que en los trabajos publicados en otras razas livianas (Campos et al., 2017; Souza et al., 2010), aunque autores como Kimura si reportan valores mayores que los reportados en razas de menor tamaño. En este estudio no se encontró relación entre el grosor útero placentario y el peso de la placenta, resultados también obtenidos en yeguas pura sangre inglés (Löf et al., 2014).

Además de la evaluación vía transrectal de la porción más caudal de la placenta, el acercamiento vía transabdominal ha demostrado tener relevancia para evaluar la placenta, teniendo en cuenta que para esta se requiere de un equipo con menos Megahertz y mayor penetración (Barton, 2011). A diferencia de la evaluación transrectal, la evaluación transabdominal tiene menor cantidad de estudios, puede deberse a la facilidad que existe hoy en día de contar con un transductor lineal para la evaluación transrectal a diferencia del transductor convexo el cual puede requerir de un equipo más costoso y de difícil acceso, además de esto Renaudin concluyó que las diferencias encontradas en esta medición mes a mes hacen que sea un método poco confiable para evaluar la condición de la placenta (Renaudin et al., 1997). Sin embargo, se ha

reportado que áreas extensas de separación están relacionadas con un ineficiente intercambio de nutrientes y por lo tanto un pronóstico negativo del neonato (Reef et al., 1996), además se ha mencionado que el acercamiento transabdominal es el método más adecuado para diagnosticar placentitis producida por *Nocardia*, la cual afecta el cuerpo y los cuernos de la placenta (Macpherson, 2006), además con este acercamiento se puede evaluar la viabilidad fetal en el último tercio de gestación.

En el este estudio se observó gran variación en los mínimos y máximos, pero se ve un aumento a medida que avanza la gestación, resultado también reportado en yeguas de grupo racial criollo colombiano (Vega, 2013), pero no en razas de mayor tamaño como pura sangre inglés (Bucca et al., 2005). Este aumento se atribuye al crecimiento fetal y el aumento en los requerimientos de oxígeno y nutrientes (Reef et al., 1996), se debe tener especial cuidado con la medición del grosor útero placentario transabdominal, ya que se ha encontrado asociación con el lugar de medición; el cuerno no gestante tiene una apariencia de pliegue engrosado, que es normal, y puede llevar a una falsa interpretación del grosor uteroplacentario, y el cuerno gestante puede parecer falsamente delgado, dependiendo de si el feto este o no en contacto con la placenta (Bucca et al., 2005). No se encontró una relación del grosor útero placentario y el peso de la placenta al parto, resultado también reportado en razas de mayor tamaño (Bucca et al., 2005).

En los últimos años ha aumentado la información disponible y el interés en equinos en lo que respecta al último tercio de la gestación, sin embargo, al comparar la información disponible que existe en humanos para evaluar gestaciones en riesgo y retraso en el crecimiento fetal, la evaluación clínica de la gestación tardía en equinos tiene todavía muchos interrogantes, por esto la importancia de la realización de estudios en esta área (28).

Para los días de gestación se tomó como referencia la fecha de inseminación artificial y se obtuvo un promedio de 336 días, la duración de la gestación en yeguas es un tema controversial, se ha descrito que puede variar por raza, edad, tamaño del potro al nacimiento, sexo del potro, genética, estado nutricional y en países con estaciones el mes de nacimiento (Clothier et al., 2017; Satué et al., 2011). Se ha reportado que una baja disponibilidad materna de nutrientes y una alta demanda del feto también puede variar la duración de la gestación (Fowden et al., 2020). Un estudio previo en neonatos de grupo racial criollo colombiano donde se evaluaron 192 neonatos reportó un promedio de 335 días de gestación (Kuhl et al., 2015), también se han encontrado diferencias entre yeguas multíparas y de un solo parto, siendo estos resultados contradictorios lo cual requiere más investigación y estudios controlados (Robles et al., 2018),

sin embargo, como en este estudio no se pudo obtener la información reproductiva completa de las receptoras no se realizó esa diferenciación.

En conclusión, es posible evaluar la concentración sérica de AFP (pg/mL) en yeguas de grupo racial criollo colombiano la cual tiene una baja variación durante el último tercio de la gestación lo que permitió determinar rangos de evaluación útiles con gestaciones clínicamente normales. Conocer los valores mínimos y máximos de los parámetros ultrasonográficos sirve de guía para evaluar yeguas del grupo racial criollo colombiano y tener parámetros de referencia para poder identificar una gestación en riesgo. Se encontró una relación entre los parámetros de desarrollo fetal y los días de gestación lo cual ayuda a la evaluación de las gestaciones en último tercio de gestación. Los parámetros de desarrollo fetal como el diámetro aórtico y la órbita fetal reportan valores menores que los reportados en razas de mayor tamaño.





---

## 3. Conclusiones y recomendaciones

### 3.1 Conclusiones

La variación de Alfafetoproteína a través del último tercio de gestación presentó su mayor variación al octavo mes de gestación con una disminución estadísticamente significativa en este mes en comparación con los otros meses evaluados. No se encontró relación entre la concentración de alfafetoproteína y los días de gestación.

Se reportan diferencias estadísticas entre sexos en el octavo mes de gestación y diferencias significativas en la concentración de AFP entre sexos en el octavo y el undécimo mes de gestación, se requiere de un mayor número de yeguas para poder realizar esta comparación entre sexos.

Respecto a la asociación entre la concentración de Alfafetoproteína y los cambios ultrasonográficos del feto y la placenta no se encontró asociación entre estos parámetros, se debe tener en cuenta que las yeguas presentaban gestaciones normales y por lo tanto no se esperaba un aumento en la concentración de Alfafetoproteína sérica.

La concentración de Alfafetoproteína fue medida por medio de un ensayo comercial de ELISA para equinos, todas las muestras fueron evaluadas por el mismo operario en el laboratorio de reproducción de la Universidad Nacional de Colombia.

A pesar de que en las yeguas cuya gestación fue producto de transferencia embrionaria los niveles de alfafetoproteína fueron más altos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre este método de reproducción y la inseminación artificial, esto permite concluir que la variabilidad de AFP sería útil para evaluar viabilidad independiente del método de reproducción. Las concentraciones de AFP reportadas pueden servir de base para nuevos estudios de biomarcadores en yeguas de grupo racial criollo colombiano.

En cuanto a la evaluación de viabilidad fetal por medio de ultrasonografía, se pudo observar el aumento de estos parámetros a medida que avanza la gestación a excepción de la frecuencia cardíaca la cual disminuye, se encontró un diámetro aórtico y una órbita fetal menor que el reportado en otras razas de mayor tamaño, no se observó un efecto de la edad de la yegua, el sexo de la cría y el método de reproducción sobre los parámetros de viabilidad.

## **3.2 Recomendaciones**

En los últimos años ha aumentado la información disponible y el interés en equinos en lo que respecta al último tercio de la gestación y sobre todo la evaluación a yeguas de alto riesgo en la gestación, sin embargo, al comparar la información disponible que existe en humanos para evaluar gestaciones en riesgo y retraso en el crecimiento fetal, la evaluación clínica de la gestación tardía en equinos tiene todavía muchos interrogantes, por esto la importancia de la realización de estudios en esta área.

En cuanto al desarrollo de este proyecto de investigación se debe tener en cuenta que el manejo de las muestras requiere cuidado y rigurosidad puesto que la Alfafetoproteína se degrada rápidamente en muestras mal conservadas. Es importante también poder contar con un número de yeguas significativo para poder dar robustez al estudio y para esto se requiere de un gran número de yeguas preñadas con similitud en la edad gestacional.









## Bibliografía

- Abd-Elnaeim, M., Leiser, R., Wilsher, S., & Allen, W. (2006). Structural and Haemovascular Aspects of Placental Growth Throughout Gestation in Young and Aged Mares. *Placenta*, 27(11–12), 1103–1113. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.11.005>
- Abdelwahid, Hind., Wahab, Babiker., Mahmoud, Mustafa., Abukonna, A., & Saeed Taha, E. A. (2018). Effects of gestational hypertension in the pulsatility index of the middle cerebral and umbilical artery, cerebro-placental ratio, and associated adverse perinatal outcomes. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 11(3), 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2018.02.001>
- Abraham, M., & Bauquier, J. (2021). Causes of equine perinatal mortality. *Veterinary Journal*, 273, 105675. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2021.105675>
- Agerholm, J. S., Klas, E. M., Damborg, P., Borel, N., Pedersen, H. G., & Christoffersen, M. (2021). A Diagnostic Survey of Aborted Equine Fetuses and Stillborn Premature Foals in Denmark. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.740621>
- Aggarwal, B. (2000). Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF- $\kappa$ B. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 59(SUPPL. 1), 6–16. [https://doi.org/10.1136/ard.59.suppl\\_1.i6](https://doi.org/10.1136/ard.59.suppl_1.i6)
- Antczak, D. F. (2020). Immunological memory and tolerance at the maternal-fetal interface: Implications for reproductive management of mares. *Theriogenology*, 150, 432–436. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.043>
- Antczak, M., Cañete, P. F., Chen, Z., Belle, C., & Yu, D. (2022). *Evolution of  $\gamma$  chain cytokines : mechanisms , methods and applications*. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.08.050>
- Bailey, C., Heitzman, J., Buchanan, C., Bare, C., Sper, R., Borst, L., Macpherson, M., Archibald, K., & Whitacre, M. (2012). B-mode and Doppler ultrasonography in pony mares with experimentally induced ascending placentitis. *Equine Veterinary Journal*, 43, 88–94. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00658.x>

- Bartkute, K., Balsyte, D., Wisser, J., & Kurmanavicius, J. (2017). Pregnancy outcomes regarding maternal serum AFP value in second trimester screening. *Journal of Perinatal Medicine*, *45*(7), 817–820. <https://doi.org/10.1515/jpm-2016-0101>
- Bazzano, M., Marchegiani, A., Troisi, A., McLean, A., & Laus, F. (2022). Serum Amyloid A as a Promising Biomarker in Domestic Animals' Reproduction: Current Knowledge and Future Perspective. *Animals*, *12*(5). <https://doi.org/10.3390/ani12050589>
- Beachler, T., Gracz, H., Long, N. M., Borst, L., Morgan, D., Nebel, A., Andrews, N., Koipillai, J., Frable, S., Bembenek, S., Ellis, K., Dollen, K. Von, Lyle, S., Gadsby, J., & Scott, C. (2019). Allantoic Metabolites , Progesterone , and Estradiol-17 b Remain Unchanged After Infection in an Experimental Model of Equine Ascending Placentitis. *Journal of Equine Veterinary Science*, *73*, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.11.014>
- Becsek, A., Tzanidakis, N., Blanco, M., & Bollwein, H. (2019). Transrectal three-dimensional fetal volumetry and crown-rump length measurement during early gestation in mares: Intra- and inter-observer reliability and agreement. *Theriogenology*, *126*, 266–271. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.012>
- Bergstrand, C. G., & Czar, B. (1956). Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, *8*(2), 174. <https://doi.org/10.3109/00365515609049266>
- Bremme, K., & Eneroth, P. (1983). Fetal sex dependent hormone levels in early pregnant women with elevated maternal serum alphafetoprotein. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, *21*, 451–457.
- Breukelman, S., Mulder, E. J. H., Oord, R. Van, Jonker, H., Van Der Weijden, B. C., & Taverne, M. A. M. (2006). Continuous fetal heart rate monitoring during late gestation in cattle by means of Doppler ultrasonography: Reference values obtained by computer-assisted analysis. *Theriogenology*, *65*(3), 486–498. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.046>
- Bucca, S. (2006). Diagnosis of the Compromised Equine Pregnancy. *Veterinary Clinics Equine*, *22*, 749–761. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2006.07.006>
- Bucca, S., Carli, A., & Fogarty, U. (2007). How to assess equine fetal viability by transrectal ultrasound evaluation of fetal peripheral pulses. *AAEP Proceedings*, *53*, 335–338.
- Bucca, S., de Oliveira, I., Cunanan, J., Vinardell, T., & Troedsson, M. (2020). Doppler indices of the equine fetal carotid artery throughout gestation. *Theriogenology*, *156*, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.07.009>
- Bucca, S., Fogarty, U., Collins, A., & Small, V. (2005a). Assessment of feto-placental well-being in the mare from mid-gestation to term: Transrectal and transabdominal

- ultrasonographic features. *Theriogenology*, 64(3), 542–557.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.011>
- Bucca, S., Fogarty, U., Collins, A., & Small, V. (2005b). Assessment of feto-placental well-being in the mare from mid-gestation to term: Transrectal and transabdominal ultrasonographic features. *Theriogenology*, 64(3), 542–557.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.011>
- Buhimschi, I. A., & Buhimschi, C. S. (2012). Proteomics/diagnosis of chorioamnionitis and of relationships with the fetal exposome. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 17(1), 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2011.10.002>
- Campos, I. S., Souza, G. N. De, Pinna, A. E., & Ferreira, A. M. R. (2017). Theriogenology Transrectal ultrasonography for measuring of combined utero- placental thickness in pregnant Mangalarga Marchador mares. *Theriogenology*, 96, 142–144.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.013>
- Canisso, I., Ball, B., Cray, C., Squires, E., & Troedsson, M. (2015). Use of a qualitative horse-side test to measure serum amyloid a in mares with experimentally induced ascending placentitis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(1), 54–59.  
<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2014.11.007>
- Canisso, I., Ball, B., Cray, C., Williams, N., Scoggin, K., Davolli, G., Squires, E., & Troedsson, M. (2014). Serum amyloid A and haptoglobin concentrations are increased in plasma of mares with ascending placentitis in the absence of changes in peripheral leukocyte counts or fibrinogen concentration. *American Journal of Reproductive Immunology*, 72(4), 376–385. <https://doi.org/10.1111/aji.12278>
- Canisso, I., Ball, B., Esteller-Vico, A., Williams, N., Squires, E., & Troedsson, M. (2017). Changes in maternal androgens and oestrogens in mares with experimentally-induced ascending placentitis. *Equine Veterinary Journal*, 49(2), 244–249.  
<https://doi.org/10.1111/evj.12556>
- Canisso, I., Ball, B., Scoggin, K., Squires, E., Williams, N., & Troedsson, M. (2015). Alpha-fetoprotein is present in the fetal fluids and is increased in plasma of mares with experimentally induced ascending placentitis. *Animal Reproduction*, 154, 48–55.  
<https://doi.org/10.7868/s0016794016050059>
- Canisso, I., Loux, S., & Lima, F. (2020). Biomarkers for placental disease in mares. *Theriogenology*, 150, 302–307. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.073>
- Capobianchi, M. R., Uleri, E., Caglioti, C., & Dolei, A. (2015). Type I IFN family members: Similarity, differences and interaction. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 26(2), 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.10.011>

- Carricka, J. B., Beggb, A. P., Perkinsc, N., & O'Meara, D. (2010). Ultrasonographic monitoring and treatment of pregnant mares at risk for placentitis. *Animal Reproduction Science*, *121*(1–2), 331–333. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.04.152>
- Challis, J., Matthews, S., Gibb, W., & Lye, S. (2000). Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocrine Reviews*, *21*(5), 514–550. <https://doi.org/10.1210/er.21.5.514>
- Chavatte-Palmer, P., Derisoud, E., & Robles, M. (2022). Pregnancy and placental development in horses: an update. *Domestic Animal Endocrinology*, *79*, 106692. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2021.106692>
- Chen, R., Lin, Y., & Huang, S. (1994). Fetal sex and maternal alpha-fetoprotein concentration at late normal singleton pregnancies. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, *73*(3), 192–194. <https://doi.org/10.3109/00016349409023437>
- Chenier, T. S., & Whitehead, A. E. (2009). Foaling rates and risk factors for abortion in pregnant mares presented for medical or surgical treatment of colic: 153 cases (1993-2005). *Canadian Veterinary Journal*, *50*(5), 481–485.
- Claes, A., & Stout, T. A. E. (2022). Success rate in a clinical equine in vitro embryo production program. *Theriogenology*, *187*, 215–218. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.04.019>
- Clothier, J., Hinch, G., Brown, W., & Small, A. (2017). Equine gestational length and location: is there more that the research could be telling us? *Australian Veterinary Journal*, *95*(12), 454–461. <https://doi.org/10.1111/avj.12653>
- Cohen, N. D., Carey, V. J., Donahue, J. G., Seahorn, J. L., & Harrison, L. R. (2003). Descriptive epidemiology of late-term abortions associated with the mare reproductive loss syndrome in central Kentucky. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *15*(3), 295–297. <https://doi.org/10.1177/104063870301500315>
- Conley, A. J. (2016). Review of the reproductive endocrinology of the pregnant and parturient mare. *Theriogenology*, *86*(1), 355–365. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.04.049>
- Coutinho da Silva, M. A., Canisso, I. F., Macpherson, M. L., Johnson, A. E. M., & Divers, T. J. (2013). Serum amyloid A concentration in healthy periparturient mares and mares with ascending placentitis. *Equine Veterinary Journal*, *45*(5), 619–624. <https://doi.org/10.1111/evj.12034>
- Curcio, B. R., Canisso, I. F., Pazinato, F. M., Borba, L. A., Feijó, L. S., Muller, V., Finger, I. S., Toribio, R. E., & Nogueira, C. E. W. (2017). Estradiol cypionate aided treatment

- for experimentally induced ascending placentitis in mares. *Theriogenology*, 102, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.010>
- Curran, S., & Ginther O.J. (1995). M- Mode Ultrasonic Assessment of Equine Heart Rate. *Theriogenology*, 44, 609–617.
- De Lange, V., Chiers, K., Lefère, L., Cools, M., Ververs, C., Govaere, J., Ducatelle, R., Hoogewijs, M., De Schauwer, C., de Kruif, A., Brito, L. F. C., Engiles, J. B., Turner, R. M., Getman, L. M., Ebling, A., Weiermayer, P., Richter, B., Farjanikish, G., Sayari, M., ... Brinsko, S. P. (2009). Testicular teratoma in a unilateral right-sided abdominal cryptorchid horse. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(3), 7.e9-7.e18. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30184-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30184-0)
- De Luca, R., Dattoma, T., Forzoni, L., Bamber, J., Palchetti, P., & Gubbini, A. (2018). Diagnostic ultrasound probes: A typology and overview of technologies. *Current Directions in Biomedical Engineering*, 4(1), 49–53. <https://doi.org/10.1515/cdbme-2018-0013>
- DeVore, G. R. (2015). The importance of the cerebroplacental ratio in the evaluation of fetal well-being in SGA and AGA fetuses. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 213(1), 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.05.024>
- Dinglas, C., Afsar, N., Cochrane, E., Davis, J., Kim, S., Akerman, M., Wells, M., Chavez, M., Herrera, K., Heo, H., & Vintzileos, A. (2020). First-trimester maternal serum alpha fetoprotein is associated with ischemic placental disease. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 222(5), 499.e1-499.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.11.1264>
- Donahue, J. M., & Williams, N. M. (2000). Emergent causes of placentitis and abortion. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, 16(3), 443–456, viii. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30088-3](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30088-3)
- Donnelly, L. (2019). Functions of the placenta. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 20(7), 392–396. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2019.04.004>
- Eckersall, P. D., & Bell, R. (2010). Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Veterinary Journal*, 185(1), 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.009>
- Endoh, C., Matsuda, K., Okamoto, M., Tsunoda, N., & Taniyama, H. (2017). Morphometric changes in the aortic arch with advancing age in fetal to mature thoroughbred horses. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(3), 661–669. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0600>

- Fedorka, C. E., Ball, B. A., Walker, O. F., McCormick, M. E., Scoggin, K. E., Kennedy, L. A., Squires, E. L., & Troedsson, M. H. T. (2021). Alterations of Circulating Biomarkers During Late Term Pregnancy Complications in the Horse Part I: Cytokines. *Journal of Equine Veterinary Science*, *99*, 103425. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103425>
- Fedorka, C. E., Ball, B. A., Wynn, M. A. A., McCormick, M. E., Scoggin, K. E., Esteller-Vico, A., Curry, T. E., Kennedy, L. A., Squires, E. L., & Troedsson, M. H. T. (2021a). Alterations of Circulating Biomarkers During Late Term Pregnancy Complications in the Horse Part II: Steroid Hormones and alpha-fetoprotein. *Journal of Equine Veterinary Science*, 103395. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103395>
- Fedorka, C. E., Ball, B. A., Wynn, M. A. A., McCormick, M. E., Scoggin, K. E., Esteller-Vico, A., Curry, T. E., Kennedy, L. A., Squires, E. L., & Troedsson, M. H. T. (2021b). Alterations of Circulating Biomarkers During Late Term Pregnancy Complications in the Horse Part II: Steroid Hormones and Alpha-Fetoprotein. *Journal of Equine Veterinary Science*, *99*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103395>
- Fedorka, C. E., Scoggin, K. E., El-Sheikh Ali, H., Loux, S. C., Dini, P., Troedsson, M. H. T., & Ball, B. A. (2021). Interleukin-6 pathobiology in equine placental infection. *American Journal of Reproductive Immunology*, *85*(5), 1–11. <https://doi.org/10.1111/aji.13363>
- Forhead, A. J., Broughton Pipkin, F., Taylor, P. M., Baker, K., Balouzet, V., Giussani, D. A., & Fowden, A. L. (2000). Developmental changes in blood pressure and the renin-angiotensin system in pony fetuses during the second half of gestation. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, *56*, 693–703.
- Fowden, A. L., Giussani, D. A., & Forhead, A. J. (2020). Physiological development of the equine fetus during late gestation. *Equine Veterinary Journal*, *52*(2), 165–173. <https://doi.org/10.1111/evj.13206>
- Frazer, G. S., Perkins, N. R., Blanchard, T. L., Orsini, J., & Threlfall, W. R. (1997). Prevalence of fetal maldispositions in equine referral hospital dystocias. *Equine Veterinary Journal*, *29*(2), 111–116. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1997.tb01651.x>
- Gaccioli, F., Aye, I. L. M. H., Sovio, U., Charnock-Jones, D. S., & Smith, G. C. S. (2018). Screening for fetal growth restriction using fetal biometry combined with maternal biomarkers. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *218*(2), S725–S737. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.12.002>
- Gaccioli, F., Lager, S., Sovio, U., Charnock-Jones, D. S., & Smith, G. C. S. (2017). The pregnancy outcome prediction (POP) study: Investigating the relationship between serial prenatal ultrasonography, biomarkers, placental phenotype and adverse

- pregnancy outcomes. *Placenta*, 59, S17–S25.  
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.10.011>
- Galvin, N. P., & Corley, K. T. T. (2010). Causes of disease and death from birth to 12 months of age in the Thoroughbred horse in Ireland. *Irish Veterinary Journal*, 63(1), 37–43. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-63-1-37>
- Gammill, H. S., Fraer, L. M., & Simhan, H. N. (2003). Racial Disparity in Midtrimester Maternal Serum Alfafetoprotein (MSAFP) as a Marker for Spontaneous Preterm Birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 189(6), 392.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajog.2003.10.394>
- Ginther, O. J. (2007). *Ultrasonic imaging and animal reproduction colors doppler ultrasonography*. Equisevices Publishing.
- Ginther, O. J. (2014). How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. *Theriogenology*, 81(1), 112–125.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.007>
- Ginther, O. J. (2021). Equine embryo mobility. A game changer. *Theriogenology*, 174, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.08.006>
- Girard, S., Tremblay, L., Lepage, M., & Alerts, E. (2022). *IL-1 Receptor Antagonist Protects against Placental and Neurodevelopmental Defects Induced by Maternal Inflammation*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903349>
- Grandjean, P. (1995). Biomarkers in Epidemiology. *European Beckman Conference*, 41(12), 1800–1803.
- H El-Sheikh Ali, E L Legack, K E Scoggin, S C Loux, P Dini, A Esteller-Vico, A J Conley, S. D. S. and B. A. B. (2020). Steroid synthesis and metabolism in the equine placenta during placentitis. *Society for Reproduction and Fertility*, 159, 289–302.  
<https://doi.org/10.1530/REP-11-0286>
- Haneda, S., Dini, P., Esteller-Vico, A., Scoggin, K. E., Squires, E. L., Troedsson, M. H., Daels, P., Nambo, Y., & Ball, B. A. (2021). Estrogens regulate placental angiogenesis in horses. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 1–17.  
<https://doi.org/10.3390/ijms222212116>
- Hartwig, F. P., Antunez, L., Dos Santos, R. S., Lisboa, F. P., Pfeifer, L. F. M., Nogueira, C. E. W., & Curcio, B. da R. (2013). Determining the gestational age of crioulo mares based on a fetal ocular measure. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(7), 557–560. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.08.203>
- Hendriks, W. K., Colenbrander, B., van der Weijden, G. C., & Stout, T. A. E. (2009). Maternal age and parity influence ultrasonographic measurements of fetal growth in

- Dutch Warmblood mares. *Animal Reproduction Science*, 115(1–4), 110–123.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.12.014>
- Henry Barton, M. (2011). Understanding abdominal ultrasonography in horses: which way is up? *Compendium (Yardley, PA)*, 33(9).
- Hong, C. B., Donahue, J. M., Giles, R. C., Petrites-Murphy, M. B., Poonacha, K. B., Roberts, A. W., Smith, B. J., Tramontin, R. R., Tuttle, P. A., & Swerczek, T. W. (1993). Equine abortion and stillbirth in central Kentucky during 1988 and 1989 foaling seasons. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5(4), 560–566.  
<https://doi.org/10.1177/104063879300500410>
- Hong C.B, Donahue, J. M., Giles, R. C., Poonacha, K. B., Roberts, A. W., Smith, B. J., Tramontin, R. R., Tuttle, P. A., & Swerczek, T. W. (1993). Etiology and pathology of equine placentitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5(1), 56–63.
- Hu, J., Zhang, J., Chan, Y., & Zhu, B. (2019). A rat model of placental inflammation explains the unexplained elevated maternal serum alpha-fetoprotein associated with adverse pregnancy outcomes. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 45(10), 1980–1988. <https://doi.org/10.1111/jog.14085>
- Huerta-Enochian, G., Katz, V., & Erfurth, S. (2001). The association of abnormal  $\alpha$ -fetoprotein and adverse pregnancy outcome: Does increased fetal surveillance affect pregnancy outcome? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 184(7), 1549–1555. <https://doi.org/10.1067/mob.2001.114864>
- Hughes, A. E., Sovio, U., Gaccioli, F., Cook, E., Charnock-Jones, D. S., & Smith, G. C. S. (2019). The association between first trimester AFP to PAPP-A ratio and placentally-related adverse pregnancy outcome. *Placenta*, 81(April), 25–31.  
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.04.005>
- Hughes, C. E., & Nibbs, R. J. B. (2018). A guide to chemokines and their receptors. *FEBS Journal*, 285(16), 2944–2971. <https://doi.org/10.1111/febs.14466>
- Incze, B. B. A., Aska, F. B., & Zenci, O. S. (2015). Fetal heart rate and fetal heart rate variability in Lipizzaner broodmares. *Acta Veterinaria Hungarica*, 63(1), 89–99.  
<https://doi.org/10.1556/AVet.2015.007>
- Isani, G., Ferlizza, E., Cuoghi, A., Bellei, E., Monari, E., Bianchin Butina, B., & Castagnetti, C. (2016). Identification of the most abundant proteins in equine amniotic fluid by a proteomic approach. *Animal Reproduction Science*, 174, 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.10.003>
- Jacobsen, S., & Andersen, P. H. (2007). The acute phase protein serum amyloid a (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equine Veterinary Education*, 19(1), 38–46.  
<https://doi.org/10.2746/095777307X177235>

- Kamata, S., Akahoshi, N., & Ishii, I. (2015). 2D DIGE proteomic analysis highlights delayed postnatal repression of  $\alpha$ -fetoprotein expression in homocystinuria model mice. *FEBS Open Bio*, *5*, 535–541. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2015.06.008>
- Kasahara, Y., Yoshida, C., Saito, M., & Kimura, Y. (2021). Assessments of Heart Rate and Sympathetic and Parasympathetic Nervous Activities of Normal Mouse Fetuses at Different Stages of Fetal Development Using Fetal Electrocardiography. *Frontiers in Physiology*, *12*(April), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.652828>
- Kelleman, A. (2014). Equine Pregnancy and Clinical Applied Physiology. *59th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners - AAEP*, *59*, 350–358.
- Kimura, Y., Haneda, S., Aoki, T., Furuoka, H., Miki, W., Fukumoto, N., Matsui, M., & Nambo, Y. (2018). Combined thickness of the uterus and placenta and ultrasonographic examinations of uteroplacental tissues in normal pregnancy, placentitis, and abnormal parturitions in heavy draft horses. *Journal of Equine Science*, *29*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1294/jes.29.1>
- Klein, C. (2016). Theriogenology The role of relaxin in mare reproductive physiology : A comparative review with other species. *Theriogenology*, *86*(1), 451–456. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.061>
- Kotoyori, Y., Yokoo, N., Ito, K., Murase, H., Sato, F., Korosue, K., & Nambo, Y. (2012). Three-dimensional ultrasound imaging of the equine fetus. *Theriogenology*, *77*(7), 1480–1486. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.020>
- Krakowski, L., Brodzki, P., Krakowska, I., Opielak, G., Marczuk, J., & Piech, T. (2020). The Level of Prolactin, Serum Amyloid A, and Selected Biochemical Markers in Mares Before and After Parturition and Foal Heat. *Journal of Equine Veterinary Science*, *84*, 102854. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.102854>
- Kuhl, J., Stock, K. F., Wulf, M., & Aurich, C. (2015). Maternal lineage of Warmblood mares contributes to variation of gestation length and bias of foal sex ratio. *PLoS ONE*, *10*(10), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139358>
- Lanci, A., Castagnetti, C., Ranciati, S., Sergio, C., & Mariella, J. (2019). A regression model including fetal orbit measurements to predict parturition in Standardbred mares with normal pregnancy. *Theriogenology*, *126*, 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.020>
- Laugier, C., Foucher, N., Sevin, C., Leon, A., & Jakcie, T. (2011). A 24-Year Retrospective Study of Equine Abortion in Normandy (France ). *Journal of Equine Veterinary Science*, *31*(3), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2010.12.012>

- Lee, W., & Roh, Y. (2017). Ultrasonic transducers for medical diagnostic imaging. *Biomedical Engineering Letters*, 7(2), 91–97. <https://doi.org/10.1007/s13534-017-0021-8>
- Legacki, E. L., Corbin, C. J., Ball, B. A., Wynn, M., Loux, S., Stanley, S. D., & Conley, A. J. (2016). Progesterin withdrawal at parturition in the mare. *Reproduction*, 152(4), 323–331. <https://doi.org/10.1530/rep-16-0227>
- Legacki, E. L., Scholtz, E. L., Ball, B. A., Esteller-Vico, A., Stanley, S. D., & Conley, A. J. (2019). Concentrations of sulphated estrone, estradiol and dehydroepiandrosterone measured by mass spectrometry in pregnant mares. *Equine Veterinary Journal*, 51(6), 802–808. <https://doi.org/10.1111/evj.13109>
- Löf, H., Gregory, J. W., Neves, A. P., Jobim, M. I. M., Gregory, R. M., & Mottos, R. C. (2014). Combined thickness of the uterus and placenta (CTUP) as indicator of placentitis in Thoroughbred mares. *Pferdeheilkunde*, 30(1), 37–41. <https://doi.org/10.21836/pem20140105>
- MacLaren, G., Kluger, R., Prior, D., Royse, A., & Royse, C. (2006). Tissue Doppler, Strain, and Strain Rate Echocardiography: Principles and Potential Perioperative Applications. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 20(4), 583–593. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2006.02.034>
- Macpherson, M. L. (2006). Diagnosis and Treatment of Equine Placentitis. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 22(3), 763–776. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2006.08.005>
- Maserati, M., & Mutto, A. (2016). In Vitro Production of Equine Embryos and Cloning: Today's Status. *Journal of Equine Veterinary Science*, 41, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.04.004>
- Matsui, K., Sugano, S., Masuyama, I., Akio, A., & KANO, Y. (1984). Alterations in the heart rate of thoroughbred Horse, Pony and Holstein Cow through Pre and Post Natal Stages. *Japan Journal of Veterinary Science*, 46(4), 505–510.
- Mayeux, R. (2004). Biomarkers: Potential Uses and Limitations. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1(2), 182–188. <https://doi.org/10.1602/neurorx.1.2.182>
- McGladeery A., O. J. (2016). Vascular Impedance Of The Umbilical Cord Artery During Equine Pregnancy. *Equine Veterinary Journal*, 48, 10–11.
- McKinnon, A., Squires, E. L., Vaala, W. E., & Varner, D. (2011). *Equine Reproduction* (2nd ed., Vol. 1). Blackwell.
- Mette, C., Camilla Dooleweerd, B., Stine, J., Anders Miki, B., Morten Roenn, P., & Henrik, L. J. (2010). Evaluation of the systemic acute phase response and

- endometrial gene expression of serum amyloid A and pro- and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally induced endometritis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 138(1–2), 95–105.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.07.011>
- Mizejewski, G. J. (2001). Alpha-fetoprotein structure and function: Relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. In *Experimental Biology and Medicine* (Vol. 226, Issue 5, pp. 377–408). <https://doi.org/10.1177/153537020122600503>
- Morel, M. C. G. D. (2016). *Equine Reproductive Physiology , Breeding and Stud Management* (Issue July).
- Morris, S., Kelleman, A. A., Stawicki, R. J., Hansen, P. J., Sheerin, P. C., Sheerin, B. R., Paccamonti, D. L., & LeBlanc, M. M. (2007). Transrectal ultrasonography and plasma progesterin profiles identifies fetoplacental compromise in mares with experimentally induced placentitis. *Theriogenology*, 67(4), 681–691.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.05.021>
- Murase, H., Endo, Y., Tsuchiya, T., Kotoyori, Y., & Shikichi, M. (2014). Ultrasonographic Evaluation of Equine Fetal Growth Throughout Gestation in Normal Mares Using a Convex Transducer Ultrasonographic Evaluation of Equine Fetal Growth Throughout Gestation in Normal Mares Using a Convex Transducer. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(7), 947–953. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0259>
- Nagel, C., Aurich, J., & Aurich, C. (2010). Determination of heart rate and heart rate variability in the equine fetus by fetomaternal electrocardiography. *Theriogenology*, 73(7), 973–983. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.026>
- Nagel, C., Aurich, J., Palm, F., & Aurich, C. (2011). Heart rate and heart rate variability in pregnant warmblood and Shetland mares as well as their fetuses. *Animal Reproduction Science*, 127(3–4), 183–187.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.07.021>
- Nagel, C., Erber, R., Ille, N., von Lewinski, M., Aurich, J., Möstl, E., & Aurich, C. (2014). Parturition in horses is dominated by parasympathetic activity of the autonomous nervous system. *Theriogenology*, 82(1), 160–168.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.03.015>
- Newby, D., Dalgliesh, G., Lyall, F., & Aitken, D. A. (2005). Alpha-fetoprotein and alpha-fetoprotein receptor expression in the normal human placenta at term. *Placenta*, 26(2–3), 190–200. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.06.005>
- Ousey, J. C. (2006). Hormone Profiles and Treatments in the Late Pregnant Mare. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 22(3), 727–747.  
<https://doi.org/10.1016/j.cveq.2006.08.004>

- Pazinato, F. M., Curcio, B. R., Fernandes, C. G., Feijó, L. S., Schmith, R. A., & Nogueira, C. E. W. (2016). Histological features of the placenta and their relation to the gross and data from Thoroughbred mares. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, *36*(7), 665–670. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000700018>
- Platt, H. (1978). Growth and maturity in the equine fetus. *Journal of the Royal Society of Medicine*, *71*(9), 658–661. <https://doi.org/10.1177/014107687807100906>
- Pozor, M. A., Sheppard, B., Hinrichs, K., Kelleman, A. A., Macpherson, M. L., Runcan, E., Choi, Y. H., Diaw, M., & Mathews, P. M. (2016). Placental abnormalities in equine pregnancies generated by SCNT from one donor horse. *Theriogenology*, *86*(6), 1573–1582. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.017>
- Raś, A., & Raś-Noryńska, M. (2021). A retrospective study of twin pregnancy management in mares. *Theriogenology*, *176*, 183–187. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.09.018>
- Razquin-Echeverriarza, P., McCue, P. M., Cappella-Flores, P., Vargas-Leitón, B., & Estrada-König, S. (2019). Ultrasonographic measurement of the equine fetal vitreous body length for predicting days to parturition in Pura Raza Española horses. *Ciencias Veterinarias*, *37*(2), 1–10. <https://doi.org/10.15359/rcv.37-2.1>
- Reef, V. B., Vaala, W. E., Worth, L. T., Spencer, P. A., & Hammett, B. (1995). Ultrasonographic Evaluation of the Fetus and Intrauterine Environment in Healthy Mares During Late Gestation. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, *36*(6), 533–541. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.1995.tb00308.x>
- Reef, V., Vaala, W., Worth, L., Sertich, P., & Pamela, A. (1996). Ultrasonographic assessment of fetal well-being during late gestation : development of an equine biophysical profile. *Equine Veterinary Journal*, *28*, 200–208.
- Renaudin, C., Gillis, C. L., Tarantal, A. F., & Coleman, D. A. (2000). Evaluation of equine fetal growth from day 100 of gestation to parturition by ultrasonography. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, *56*, 651–660.
- Renaudin, C., Liu, I. K. M., Troedsson, M. H. T., & Schrenzel, M. D. (1999). Transrectal ultrasonographic diagnosis of ascending placentitis in the mare: A report of two cases. *Equine Veterinary Education*, *11*(2), 69–74. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.1999.tb00924.x>
- Renaudin, CD., Troedsson, M. H. T., Gillis, C. L., King, V. L., & Bodena, A. (1997). Ultrasonographic evaluation of the equine placenta by transrectal and transabdominal approach in the normal pregnant mare. *Theriogenology*, *47*, 559–573.
- Requena, F. D., Agüera, E. I., Requena, F., & Pérez-marín, C. C. (2017). Transrectal ultrasonographic measurements of the combined thickness of the uterus and

- placenta in Spanish Purebred mares. *Animal Reproduction*, *14*, 1278–1284.  
<https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR0029>
- Rizzo, A., Galgano, M., Mutinati, M., & Sciorsci, R. L. (2019). Alpha-fetoprotein in animal reproduction. *Research in Veterinary Science*, *123*(October 2018), 281–285.  
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.028>
- Robertson, H. A., Saunders, N. R., & Lorscheider, F. L. (1984). Distribution of alpha-fetoprotein in fetal plasma and in amniotic and allantoic fluids of the pig. *Journals of Reproduction & Fertility*, *70*, 605–607.
- Robles, M., Dubois, C., Gautier, C., Dahirel, M., Guenon, I., & Bouraima-lelong, H. (2018). Theriogenology Maternal parity affects placental development , growth and metabolism of foals until 1 year and a half. *Theriogenology*, *108*, 321–330.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.019>
- Rosenstreich, D. L., & Wahl, S. M. (1979). Cellular Sources of Lymphokines. In *Biology of the Lymphokines*. ACADEMIC PRESS, INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-178250-4.50013-1>
- Ross, J., Palmer, J. E., & Wilkins, P. A. (2008). Body wall tears during late pregnancy in mares: 13 cases (1995-2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *232*(2), 257–261. <https://doi.org/10.2460/javma.232.2.257>
- Saini, N. S., Mohindroo, J., Mahajan, S. K., Raghunath, M., Kumar, A., Sangwan, V., Singh, T., Singh, N., Singh, S. S., Anand, A., & Singh, K. (2013). Surgical Correction of Uterine Torsion and Mare-Foal Survival in Advance Pregnant Equine Patients. *Journal of Equine Veterinary Science*, *33*(1), 31–34.  
<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.04.012>
- Salameh, M., Lee, J., Palomaki, G., Eklund, E., Curran, P., Suarez, J. A. R., Lambert-Messerlian, G., & Bourjeily, G. (2018). Snoring and markers of fetal and placental wellbeing. *Clinica Chimica Acta*, *485*(April), 139–143.  
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.06.039>
- Sandra, N., & Wilsher, A. (2009). Studies in Equine Reproduction. In *University of Bedfordshire*. University of Bedfordshire.
- Satué, K., Felipe, M., Mota, J., & Muñoz, A. (2011). Factors influencing gestational length in mares: A review. *Livestock Science*, *136*(2–3), 287–294.  
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.09.011>
- Satué, K., Marcilla, M., Medica, P., Ferlazzo, A., & Fazio, E. (2018). Sequential concentrations of placental growth factor and haptoglobin, and their relation to

- oestrone sulphate and progesterone in pregnant Spanish Purebred mare. *Theriogenology*, 115, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.033>
- Schieving, J. H., De Vries, M., Van Vugt, J. M. G., Weemaes, C., Van Deuren, M., Nicolai, J., Wevers, R. A., & Willemsen, M. A. (2014). Alpha-fetoprotein, a fascinating protein and biomarker in neurology. *European Journal of Paediatric Neurology*, 18(3), 243–248. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2013.09.003>
- Shikichi, M., Iwata, K., Ito, K., Miyakoshi, D., Murase, H., Sato, F., Korosue, K., Nagata, S., & Nambo, Y. (2017). Abnormal pregnancies associated with deviation in progesterin and estrogen profiles in late pregnant mares: A diagnostic aid. *Theriogenology*, 98, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.024>
- Silva, E. S. M. da, Pantoja, J. C. de F., Puoli, J. N. P., & Meira, C. (2015). Ultrasonography of the conceptus development from days 15 to 60 of pregnancy in non-cyclic recipient mares. *Ciência Rural*, 45(3), 512–518. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140517>
- Smith, K., Lai, P. C. W., Robertson, H. A., Church, R. B., & Lorscheider, F. L. (1979). allantoic fluid, amniotic fluid and maternal plasma of Distribution of alpha1-fetoprotein in fetal plasma of cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 57, 235–238.
- Snider, T. A. (2015). Reproductive Disorders in Horses. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 31(2), 389–405. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2015.04.011>
- Souza, A. M., Winter, G. H. Z., Garbade, P., Wolf, C. A., Jobim, M. I. M., Gregory, R. M., & Mattos, R. C. (2010). Ultrasonographic evaluation of the Criollo mare placenta. *Animal Reproduction Science*, 121(1–2), 320–321. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.04.131>
- Stolla, R., Bollwein, H., Weber, F., & Wosche, I. (2004). Transrectal Doppler sonography of uterine and umbilical blood flow during pregnancy in mares. *Theriogenology*, 61, 499–509. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00225-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00225-5)
- Tan, C., Murai, Y., Liu, W., Tasaka, Y., Dong, F., & Takeda, Y. (2021). Ultrasonic Doppler Technique for Application to Multiphase Flows: A Review. *International Journal of Multiphase Flow*, 144(January), 103811. <https://doi.org/10.1016/j.ijmultiphaseflow.2021.103811>
- Tang, S., Yuan, K., & Chen, L. (2022). Molecular biomarkers, network biomarkers, and dynamic network biomarkers for diagnosis and prediction of rare diseases. *Fundamental Research*, xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.fmre.2022.07.011>
- Troedsson, M. H. T. (2007). High risk pregnant mare. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49(SUPPL. 1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-49-S1-S9>

- Turner, R. M., McDonnell, S. M., Feit, E. M., Grogan, E. H., & Foglia, R. (2006). Real-time ultrasound measure of the fetal eye (vitreous body) for prediction of parturition date in small ponies. *Theriogenology*, *66*(2), 331–337. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.11.019>
- Vega, F. E. (2012). Caracterización ultrasonográfica de la unidad útero-placentaria y del feto en yeguas criollas colombianas con gestaciones normales. *Universidad Nacional de Colombia*, *5*(11), 76.
- Vega, F. E. (2013). Medidas ultrasonográficas del espesor conjunto de la unión útero-placentaria en yeguas criollas colombianas. *Acta Agronomica*, *62*(2), 148–154.
- Vietri, L., Fui, A., Bergantini, L., d'Alessandro, M., Cameli, P., Sestini, P., Rottoli, P., & Bargagli, E. (2020). Serum amyloid A: A potential biomarker of lung disorders. *Respiratory Investigation*, *58*(1), 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2019.09.005>
- Vilaregut, L., Lores, M., & Wilsher, S. (2021). The Yolk Sac of the Equine Placenta. Its Remnant and Potential Problems. *Journal of Equine Veterinary Science*, *96*, 103322. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103322>
- Vincze, B., Baska, F., Papp, M., & Szenci, O. (2019). Introduction of a new fetal examination protocol for on-field and clinical equine practice. *Theriogenology*, *125*, 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.004>
- Vincze, B., Gáspárdy, A., Kulcsár, M., Baska, F., Bálint, Á., Hegedus, G. T., & Szenci, O. (2015). Equine alpha-fetoprotein levels in Lipizzaner mares with normal pregnancies and with pregnancy loss. *Theriogenology*, *84*(9), 1581–1586. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.08.006>
- Vincze, B., Solymosi, N., Debnár, V., Kútvolgyi, G., Krikó, E., Wölfling, A., & Szenci, O. (2018). Assessment of equine alpha-fetoprotein levels in mares and newborn foals in the periparturient period. *Theriogenology*, *122*, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.08.026>
- Wald, N. J., & Bestwick, J. P. (2016). Prenatal reflex DNA screening for Down syndrome: Enhancing the screening performance of the initial first trimester test. *Prenatal Diagnosis*, *36*(4), 328–331. <https://doi.org/10.1002/pd.4784>
- Wilkins, P. A. (2003). Monitoring the pregnant mare in the ICU. *Clinical Techniques in Equine Practice*, *2*(2), 212–219. [https://doi.org/10.1016/S1534-7516\(03\)00002-7](https://doi.org/10.1016/S1534-7516(03)00002-7)
- Witters I, Coumans A, Gyselaers W, F. J. (2013). Echographic diagnosis of lumbosacral spina bifida Neural. *Tijdschrift Voor Geneeskunde*, *69*(9), 453–455.
- Wynn, M. A. A., Ball, B. A., May, J., Esteller-Vico, A., Canisso, I., Squires, E., & Troedsson, M. (2018). Changes in maternal pregnane concentrations in mares with

experimentally-induced, ascending placentitis. *Theriogenology*, 122, 130–136.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.09.001>

Wynn, M. A. A., Esteller-Vico, A., Legacki, E. L., Conley, A. J., Loux, S. C., Stanley, S. D., Curry, T. E., Squires, E. L., Troedsson, M. H., & Ball, B. A. (2018). A comparison of progesterone assays for determination of peripheral pregnane concentrations in the late pregnant mare. *Theriogenology*, 106, 127–133.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.002>

Zhang, J.-M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27–37. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194>