

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“CICLO ESTRAL DE LA PERRA”.
POR
CARLOS ERNESTO NUÑEZ MORENO**

MONOGRAFIA

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA

FEBRERO DE 2009

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“CICLO ESTRAL DE LA PERRA”.
MONOGRAFIA**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TITULO DE:**

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADO POR EL COMITÉ DE MONOGRAFÍA

PRESIDENTE DEL JURADO

MVZ CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

TORREÓN, COAH., MÉXICO

MARZO DEL 2009

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

“CICLO ESTRAL DE LA PERRA”.

MONOGRAFIA

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TITULO DE:**

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

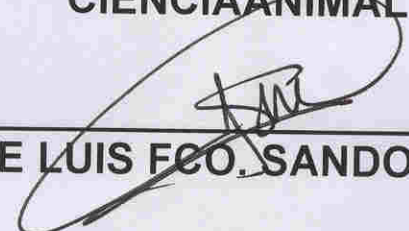
APROBADO POR EL COMITÉ DE MONOGRAFÍA

PRESIDENTE DEL JURADO



MVZ CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

**COORDINADOR DE LA DIVISION REGIONAL DE
CIENCIAANIMAL**



MC. JOSE LUIS FCO. SANDOVAL ELIAS

TORREÓN, COAH., MÉXICO

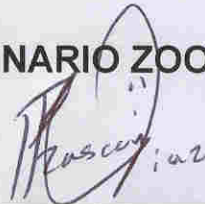
marzo de 2009

UNIVERSIDA AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA

CICLO ESTRAL DE LA PERRA

MONOGRAFIA ELABORADA BAJO LA SUPERVICION DEL COMITÉ DE
ASESORIA Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA



M.V.Z. CARLOS RAUL RAZCON DÍAZ
PRESIDENTE



M.V.Z. CUAUHEMOC FÉLIX ZORRILLA
VOGAL



I.Z. JORGE HORACIO BORUNDA RAMOS
VOCAL



I.Z. HÉCTOR MANUEL ESTRADA FLORES
VOCAL SUPLENTE

Agradecimientos:

A Dios, porque me ha permitido realizar éste sueño, que compartí con mucha gente que siempre me apoyó.

A mi Universidad, porque siempre será mi "Alma Terra Mater".

A Carlos Rascón, que formo parte fundamental en éste trabajo.

A Yasmin que a sabido darme toda su confianza y gran apoyo en situaciones buenas y malas

A todos mis amigos y compañeros con los que conviví en el transcurso de mi carrera..

A mis asesores y colaboradores, por su apoyo en la realización de éste trabajo.

Y a todos mis maestros, que contribuyeron a mi formación profesional.

Muchas gracias.

Dedicatoria:

A mis padres, Mariana y Francisco, por todo este tiempo de paciencia que me brindaron en el transcurso de mi carrera, y por todo el apoyo que siempre recibí incondicionalmente por parte de ellos.

A mis hermanos Dalia Mariana y Luis Jorge, que siempre compartieron todo conmigo, situaciones buenas y malas, sueños y realidades.

Al Sr. Cruz Meraz Salas quien siempre ha estado conmigo y me ha sabido apoyar como un padre.

A todos mis seres queridos, que no menciono por temor a olvidar a alguno.

A la memoria de todos mis seres queridos que ya no pueden estar conmigo.

Sinceramente Carlos E. Nuñez Moreno

RESUMEN

El ciclo estral de la perra, comprende las diferentes etapas que suceden a lo largo de la vida reproductiva (antes, después y durante el celo) es necesario determinar el momento exacto en que nuestra perra domestica entrara en su fase reproductiva y así lograr el optimo rendimiento viéndolo desde el punto de vista zootécnico, para lo que es necesario saber mas a fondo la anatomía y fisiología de la perra.

Existen varios métodos en los cuales nos podemos apoyar para llevara cavo un buen diagnostico con respecto a ala ovulación de la perra y así determinar el momento exacto para llevarse acabo la monta y poder lograr mejores resultados en la reproducción.

Palabras clave: Ciclo estral, citología, vaginoscopia, draminski, citología vaginal, métodos de diagnostico, fisiología de la reproducción, anatomia

INDICE:

INTRODUCCIÓN	1
---------------------------	---

I. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL PERRA.....2

1.1. Hembra	2
1.1.1. Órganos genitales de la hembra.....	2
1.1.1.1. Ovarios.....	2
1.1.1.2. Trompas uterinas.....	3
1.1.1.3. Útero.....	3
1.1.1.4. Cérvix.....	4
1.1.1.5. Vagina.....	4
1.1.1.6. Vestíbulo vaginal.....	4
1.1.2. Genitales externos.....	5
1.1.2.1. Vulva.....	5
1.1.2.2. Clítoris.....	5
1.1.2.3. Uretra femenina.....	6
1.1.2.4. Glándulas mamarias.....	6

II. ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN.....6

2.1. Hormonas Hipotalámicas	6
2.1.1. Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)	6

2.2. Hormonas Hipofisarias	7
2.2.1. Hormona Folículo Estimulante (FSH)	7
2.2.2. Hormona Luteinizante (LH)	7
2.2.3. Prolactina.....	8
2.3. Hormonas foliculares	8
2.3.1. Estrógenos.....	8
2.3.2. Progesterona.....	9
2.3.3. Prostaglandinas.....	9
2.3.4. Andrógenos.....	9
2.3.5. Inhibina.....	10

III. FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN.....10

3.1. Fisiología de la Reproducción de la Hembra	10
3.1.1. Ovogénesis.....	11
3.1.2. Fisiología del ciclo estral.....	11
3.1.2.1. Etapas del ciclo estral.....	13
a) Proestro.....	13
b) Estro.....	14
c) Metaestro.....	16

d)	Diestro.....	16
e)	Anestro.....	17

IV. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE ESTRO.....19

4.1. Citología Vaginal.....19

4.1.1. Fundamento de la citología vaginal exfoliativa.....19

4.1.2. Clasificación de las células vaginales.....20

4.1.3. Tipos de células presentes en cada fase del ciclo estral.....20

4.1.3.1. Proestro.....20

4.1.3.2. Estro.....21

4.1.3.3. Diestro.....21

4.1.4. Técnica de citología vaginal exfoliativa.....21

4.2 DRAMINSKY22

4.2.1. Manual de uso del detector de ovulación draminski.....22

4.2.2. Descripción.....23

4.2.3. Operación.....24

4.2.4. Familiarización.....24

4.2.5. Medidas.....25

4.2.6. Tomando lectura.....25

4.2.7. Insertando sonda.....26

4.2.8. Para obtener medida o lectura.....26

4.2.9. Desinfección.....28

4.2.10. Condiciones para un uso adecuado.....29

4.3. Vaginoscopía.....30

V. DETECCIÓN DE LA OVULACIÓN.....30

5.1. Métodos de Diagnóstico de la ovulación.....31

5.1.1. Señales fisiológicas.31

5.1.2. Monitoreo de estrógeno.31

5.1.3. Pico de la Hormona Luteinizante (LH)32

5.1.3.1. Pruebas para la determinación de los niveles de Hormona Luteinizante.....32

5.1.3.1.1. Prueba de orina.....33

5.1.3.1.2. Prueba en suero.....33

5.1.4. Aumento de Progesterona.....33

5.1.5. Citología vaginal.....34

5.1.6 Test de ovulación.....35

LITERATURA CITADA.....39

INTRODUCCIÓN

El ciclo estral de la perra comprende las modificaciones estructurales y de las conductas que sufren las hembras domésticas una vez que alcanzan la pubertad y que repite de forma periódica y caracteriza seguir la especie.

Desde el punto de vista reproductivo, se define como una especie con ciclo sexual monoestríco de ovulación espontánea. El intervalo, interestro, definido como el tiempo desde el comienzo de un ciclo estral hasta el inicio del próximo, posee una variación de entre 5-11 meses dependiendo de la raza. En este sentido, las perras presentan un intervalo entre ciclo y ciclo de 120 días en promedio que corresponde con la fase lútea.

Las perras domésticas suelen presentar dos ciclos estrales al año, variando entre uno y tres ciclos al año; dependiendo de factores como: raza, edad, nutrición y el individuo, por lo que pasa gran parte del año en reposo sexual, así las hembras de raza rottweiler parecen estar predispuestas a manifestar intervalos interestro cortos, mientras que en la raza basenji, galgos; y otros cánidos silvestres tienden a mostrar intervalos de interestro largos (de 10- a 12 meses), el ciclo estral de la perra, con una duración media de 18 días está constituida por 4 fases (proestro, estro, diestro y anestro. (GOODWIN et al 1991)

A continuación se mostrará un resumen de las diferentes etapas del ciclo, a sí mismo como podemos identificar cada una de ellas.

I. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL PERRA

1.1. Hembra

1.1.1. Órganos genitales de la hembra

1.1.1.1. Ovarios

Los ovarios son pequeños, tienen forma oval alargada y son aplanados, y su tamaño depende de la fase del ciclo estral en la que se encuentre la hembra. La longitud media es de 2 cm. en la perra (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993).

Cada ovario está situado comúnmente a corta distancia (1 a 2 cm.) caudal, o bien, en contacto con el polo caudal del correspondiente riñón, y por tanto, asienta a la altura de las vértebras L III o L IV, o la mitad del recorrido existente entre la última costilla y la cresta del ilion. El ovario derecho asienta entre la parte derecha del duodeno y la pared abdominal lateral. El izquierdo está relacionado lateralmente con el bazo (Esquivel, 2002; Sisson *et al.*, 1993).

En la perra cada ovario está completamente envuelto por la bolsa ovárica, que tiene una hendidura que se abre centralmente. Las dos capas que forman esta bolsa contienen una gran cantidad de grasa y músculo liso. Se continúan por el cuerno del útero, para constituir el mesosalpinx y el ligamento propio del ovario (Sisson *et al.*, 1993). El ovario es considerado como glándula de función exócrina por la liberación de óvulos; y de función endócrina por su producción hormonal (Esquivel, 2002).

1.1.1.2. Trompas uterinas

Las trompas uterinas (falopianas) son estructuras tubulares que tienen de 5 a 8 cm de longitud (Sisson *et al.*, 1993). Comunican al ovario con el útero, constan

de un istmo en el extremo uterino y de una ampolla más ancha (cuando se produce fertilización) en el extremo ovárico (Allen, 1992; Esquivel, 2002).

Se encuentran sostenidas por el mesosalpinx y están formados por tres porciones:

- 1) *Infundíbulo*: Tiene forma de embudo y está cerca del ovario, es la estructura que capta al óvulo cuando es liberado.
- 2) *Ampolla*: Es la porción media y su lumen es de diámetro más amplio que el istmo.
- 3) *Istmo*: Es la conexión del cuerno úterino con el oviducto (Esquivel, 2002).

1.1.1.3. Útero

El cuerpo del útero es muy corto y tiene dos cuernos extremadamente largos (Allen, 1992; Esquivel, 2002; Sisson *et al.*, 1993). En una perra de tamaño medio, el cuerpo mide 2 a 3 cm y los cuernos 12 a 15 cm de largo (Esquivel, 2002; Sisson *et al.*, 1993), pero la longitud y la anchura del útero dependen de cambios tanto patológicos como fisiológicos (Allen, 1992). Estos cuernos son de diámetro uniforme, casi rectos y asientan totalmente dentro del abdomen. Divergen del cuerpo en forma de V hacia cada riñón. Sus partes caudales están unidas por el peritoneo (Sisson *et al.*, 1993). El cuerpo tiene una capa muscular gruesa (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993), con una luz estrecha que conecta la vagina con el útero (Allen, 1992). Dorsalmente, no existen líneas de demarcación entre el útero y la vagina, pero el cuello uterino es mucho más grueso que la vagina (Sisson *et al.*, 1993).

1.1.1.4. Cérvix

Es el órgano que separa al útero de la vagina, evitando el contacto del lumen uterino con el exterior, a excepción del momento del parto y del período de estro. El conducto cervical en la perra se caracteriza porque es vertical, con la abertura uterina dorsal y la abertura vaginal en posición ventral. El cérvix está formado por una capa circular de fibras musculares elásticas y una mucosa

formada por un epitelio que contiene células productoras de moco (Esquivel, 2002).

1.1.1.5. Vagina

Es un órgano largo y estrecho, que sirve para la cópula, se encuentra situada entre el cérvix y el vestíbulo vaginal (Esquivel, 2002). Se dirige cranealmente desde la unión vestíbulo-vaginal hasta el cuello uterino, a la altura de la 4ª ó 5ª vértebra lumbar (Allen, 1992).

La vagina está formada por una capa serosa, una capa muscular formada por fibras musculares gruesas y una mucosa con pliegues longitudinales y pequeños pliegues transversales, que facilitan el aumento de su diámetro y longitud (Allen, 1992; Esquivel, 2002; Sisson *et al.*, 1993).

Está cubierta por epitelio estratificado que es influenciado por cambios hormonales (Allen, 1992).

1.1.1.6. Vestíbulo vaginal

El vestíbulo vaginal conecta la vagina y la entrada de la uretra con al abertura genital externa (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993). En la unión vestíbulo-vaginal es importante la presencia de una estructura conocida como *cingulum*, la cual, constituye un problema para explorar la vagina, ya que es muy estrecha cuando la perra no está en estro (Esquivel, 2002). La luz vestibular asciende en un ángulo de 60°, y posteriormente recorre una distancia corta hacia delante en la pelvis hasta su unión con la vagina (Allen, 1992).

En el piso vestibular se encuentran los bulbos vestibulares, que son masas de tejido eréctil relativamente grandes (homólogos al bulbo peneano del macho), y están, comúnmente, unidos centralmente por una especie de istmo (Esquivel, 2002; Sisson *et al.*, 1993). Son considerados músculos circulares estriados que conectan el vestíbulo y la vulva (Sisson *et al.*, 1993).

Sobre la pared ventral, en posición craneal a la comisura vulvar ventral se encuentra el clítoris suspendido en un pliegue transversal de la mucosa (Allen, 1992).

1.1.2. Genitales externos

1.1.2.1. Vulva

Es la abertura del aparato genital femenino (Allen, 1992). La vulva tiene dos labios gruesos que forman una comisura ventral puntiaguda, la mucosa que la recubre es lisa y de color rojo (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993). Está situada en posición ventral al suelo de la pelvis, su tamaño depende de la raza y de la fase del ciclo estral en la que se encuentre la hembra (Allen, 1992).

1.1.2.2. Clítoris

Es el homólogo del pene en la hembra, es pequeño, ancho y plano, tiene unos 3 a 4 cm de longitud en un animal de tamaño medio (Esquivel, 2002; Sisson *et al.*, 1993). Está situado sobre la pared ventral del vestíbulo, en posición craneal a la comisura vulvar ventral suspendido en un pliegue transversal de la mucosa (Allen, 1992).

Está formado por el cuerpo y el glande. El cuerpo del clítoris no tiene estructuras eréctiles, está infiltrado de grasa, y su contenido es arterias grandes y numerosos nervios en su parte ventral. El glande está compuesto por tejido eréctil y está situado en una gran fosa. Un pliegue de mucosa se extiende caudalmente sobre el glande y la fosa (Esquivel, 2002; Sisson *et al.*, 1993).

1.1.2.3. Uretra femenina

La uretra es grande, situada en el suelo de la pelvis y la vagina, está marcada sobre el suelo de la vagina, por un engrosamiento longitudinal que alcanza el vestíbulo (Sisson *et al.*, 1993).

1.1.2.4. Glándulas mamarias

Son normalmente diez y están dispuestas en dos series, que se extienden desde la parte caudal de la región pectoral hasta la región inguinal y se designan, según su localización, como torácicas (4), abdominales (4), e inguinales (2). Los

pezones (*papilla mammae*) son cortos y sus vértices presentan de 6 a 12 orificios pequeños, llamado conductos excretorios (Sisson *et al.*, 1993).

II. ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

2.1. Hormonas Hipotalámicas

2.1.1. Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)

Es producida en el hipotálamo (en la base del encéfalo) y transportada hasta la glándula pituitaria anterior (adenohipófisis) mediante un sistema especializado de vasos sanguíneos. Esta hormona determina de forma selectiva la liberación de la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y de la Hormona Luteinizante (LH) (Allen, 1992; Ruckebusch *et al.*, 1991), éstas dos hormonas (FSH y LH) participan en el control de la reproducción en mamíferos machos y hembras (Ruckebusch *et al.*, 1991).

La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), se libera en pulsaciones casi cada dos horas. Su liberación se aumenta por la noradrenalina y el estradiol. También influyen en la liberación de GnRH las feromonas que estimulan el bulbo olfatorio y señales luminosas que actúan en la retina. La dopamina, opiodes y endorfinas inhiben la descarga de GnRH. También el tratamiento prolongado con corticosteroides y el estrés tienen una retroalimentación negativa en la producción de GnRH por el hipotálamo. Cuando los niveles de estradiol son altos, el GnRH

favorece la producción de la Hormona Luteinizante (LH) en lugar de Hormona Folículo Estimulante (FSH). En contraste, altas concentraciones de progesterona y bajas de estrógenos apoyan una producción hipotalámica de GnRH, dando así prioridad a producir FSH (Ruckebusch *et al.*, 1991).

2.2. Hormonas Hipofisarias

2.2.1. Hormona Folículo Estimulante (FSH)

Es sintetizada y liberada en la adenohipófisis por estimulación de la hormona liberadora de gonadotropinas hipotalámicas (GnRH) (Ruckebusch *et al.*, 1991). En la hembra es la responsable de estimular el desarrollo de los folículos en los ovarios (Allen, 1992; Ruckebusch *et al.*, 1991). No han sido bien determinadas las concentraciones circulantes en la perra (Allen, 1992). La síntesis y liberación de Hormona Folículo Estimulante (FSH), está bajo la influencia de altas concentraciones sostenidas de estradiol. Por el contrario una elevación de progesterona aumenta la producción de GnRH, estimula la producción de FSH (Ruckebusch *et al.*, 1991). En el macho es responsable de la estimulación de algunos de los procesos en la espermatogénesis (Allen, 1992; Ruckebusch *et al.*, 1991).

2.2.2. Hormona Luteinizante (LH)

Es producida en la adenohipófisis por estimulación de la hormona liberadora de gonadotropinas hipotalámicas (GnRH) (Ruckebusch *et al.*, 1991). En la hembra es liberada en forma de pulsaciones cortas y la frecuencia de éstas pulsaciones aumenta 1 ó 2 semanas antes de comenzar el proestro. Las concentraciones circulantes aumentan hasta alcanzar un máximo 48 horas antes de que ocurra la ovulación, por eso se le conoce como hormona ovulatoria (Allen, 1992; Ruckebusch *et al.*, 1991). Su función es estimular la maduración, luteinización y ovulación de los folículos ováricos (Allen, 1992), y mantiene la luteinización folicular en la hembra que ovula (Ruckebusch *et al.*, 1991), por lo cual se considera luteotrófica (mantiene el funcionamiento de los cuerpos luteos) (Allen, 1992).

En el macho es la responsable de la estimulación de las células intersticiales (células de Leydig) en el testículo para producir testosterona y dihidrotestosterona, y por lo tanto se le conoce como hormona estimulante de las células intersticiales (ICSH) (Allen, 1992; Ruckebusch *et al.*, 1991).

Al inicio de la pubertad, los niveles altos de Hormona Luteinizante inducen a los testículos para producir testosterona, que llevará a la maduración de los espermatozoides (Davol, 2001).

2.2.3. Prolactina

Producida y liberada por la adenohipófisis. Actúa sobre la glándula mamaria para estimular la producción de leche. Sus concentraciones en sangre suelen aumentar de acuerdo a la disminución de las concentraciones de progesterona, aunque en algunos casos la progesterona puede estimular la liberación de prolactina. La prolactina también es considerada luteotrófica (mantiene el funcionamiento del cuerpo lúteo) (Allen, 1992).

2.3. Hormonas foliculares

2.3.1. Estrógenos

Hormonas esteroides producidas en la perra por folículos en crecimiento. Los principales son 17α -estradiol, 17β -estradiol y estrona, algunos de los cuales pueden ser conjugados. Las concentraciones circulantes aumentan poco días antes del inicio del proestro, posteriormente se produce un aumento brusco de sus concentraciones en sangre, alcanzando su máximo 48 horas antes de la oleada de LH (Allen, 1992).

Los estrógenos determinan cambios que tienen lugar en el proestro, como pueden ser: (Allen, 1992)

- a) Flujo vaginal
- b) Engrosamiento de la mucosa vaginal
- c) Cambio en la consistencia de la mucosidad cervical
- d) Tumefacción de la vulva
- e) Producción de feromonas

2.3.2. Progesterona

Es una hormona esteroide producida por folículos maduros y por el cuerpo lúteo. Las concentraciones circulares aumentan cuando los estrógenos alcanzan su máximo, al final del proestro. La hormona es producida por las células de la granulosa en vías de luteinización en los folículos intactos (Allen, 1992).

Los valores en el plasma aumentan de forma constante a un promedio de 2 a 3 ng./ml. y se incrementan en el momento de la ovulación a más de 5 ng./ml. (5 a 8 ng./ml.), las concentraciones máximas se alcanzan unos 20 días después de finalizado el estro, se encuentre la perra en gestación o no. Posteriormente se produce un descenso gradual hasta sus valores mínimos, que son alcanzados 60 a 70 días después de la ovulación (Allen, 1992 Davol, 2000 Hutchison, 2001).

2.3.3. Prostaglandinas

En la perra la producción espontánea de prostaglandina por el útero no es responsable de la lisis de los cuerpos lúteos, tal como sucede en otras especies. Los cuerpos lúteos en la perra dejan de ser funcionales de forma gradual debido a la ausencia de un apoyo trófico (LH y/o prolactina) o porque tienen un ciclo vital limitado (Allen, 1992), de 63 días en las hembras preñadas y de 100 días en las hembras no gestantes (Esquivel, 2002)

2.3.4. Andrógenos

Son producidos por células en los testículos que forman pequeños islotes entre los túbulos seminíferos; estas son las células intersticiales o células de Leydig (Allen, 1992).

La conversión de testosterona a dihidrotestosterona inducirá el desarrollo de la glándula próstata, la uretra masculina, el pene, y el escroto (Allen, 1992; Davol, 2001). Después, los testículos descienden al escroto y completan el desarrollo del sistema reproductor masculino (Davol, 2001). Los efectos adicionales de la testosterona incluirán la inducción de otras características físicas del género así como los rasgos de conducta, incluyendo la conducta de apareamiento y marcando de territorio con orina (Allen, 1992; Davol, 2001). En los perros adultos las concentraciones de testosterona en plasma varían entre 0,5 y

5,0 ng./ml. En perros castrados, los valores son inferiores a 200 pg./ml. (Allen, 1992).

Se desconocen las funciones de éstas hormonas en la perra, pero se sabe que sus concentraciones circulantes alcanzan un máximo al mismo tiempo que la oleada de LH (Allen, 1992).

2.3.5. Inhibina

Esta es una hormona producida en los testículos por las células de Sertoli que inhibe la liberación de FSH (Allen, 1992; Davol, 2000; Ruckebusch *et al.*, 1991). No se ha demostrado su existencia en el perro (Allen, 1992)

III. FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

3.1. Fisiología de la Reproducción de la Hembra

La perra se clasifica como un animal monoéstrico que presenta de uno a tres ciclos estrales en un año. La ovulación se presenta 24 a 48 horas después del inicio de la etapa del estro liberando el o los óvulos en fase de ovocito primario el cual alcanza su madurez aproximadamente 108 horas después de la ovulación. Finalmente la duración de la fase lútea del ciclo estral de la perra no gestante (diestro) es muy similar a la fase lútea de la perra gestante (Davol, 2001; Esquivel, 2002).

3.1.1. Ovogénesis

La perra tiene dos ovarios que producirán los óvulos. En los ovarios, los óvulos se encuentran dentro de folículos que crecen hacia la superficie del ovario. Cuando FSH y LH empiezan a ser secretadas en cantidades altas durante el inicio de la madurez sexual, los ovarios y los folículos dentro de ellos empezarán a crecer. Dentro de estos folículos, se secreta la hormona llamada estrógeno. Esta hormona es un químico biológico que produce cambios fisiológicos y sociales en la perra, que señalará el deseo de aparearse (Davol, 2000).

La perra ovula liberando un óvulo en un estado de inmadurez conocido como ovocito primario de tal manera que la segunda meiosis concluye después de la ovulación en el segmento distal del oviducto. En estudios *in vitro* se ha visto que el espermatozoide del perro es capaz de penetrar ovocitos inmaduros y formar el pronúcleo masculino, sin embargo, el término fertilización se refiere a la fusión del pronúcleo femenino con el masculino, situación que se presenta hasta la maduración del ovocito. El tiempo exacto de la maduración del ovocito no ha sido determinado aún, sin embargo, algunos estudios sugieren que este fenómeno puede ocurrir desde 2 hasta 6 días después de la ovulación. (Morton, 1986; Allen, 1992; Hutchison, 2001; Esquivel, 2002).

3.1.2. Fisiología del ciclo estral

La fisiología reproductiva de la perra es compleja, lo que ha provocado que los propietarios o los médicos veterinarios se confundan al recomendar el momento preciso para la cruce ya que existe gran variabilidad en la duración de las etapas del ciclo estral, un ejemplo clásico es el hecho de cruzar a la perra después del día 9 o cuando el sangrado desaparece, lo que da como resultado un margen de error muy alto (Allen, 1992; Davol, 2000; Hutchison, 2001; Esquivel, 2002).

Antes de la madurez sexual de la perra, se secretan hormonas gonadotrópicas en cantidades muy pequeñas y por consiguiente, los ovarios permanecen inactivos. Sin embargo, alrededor de la edad de 6 meses, la hipófisis empieza a secretar los niveles más altos de las hormonas gonadotrópicas llamadas Hormona Folículo Estimulante (FSH) y hormona luteal (LH). La elevación de FSH y LH en la perra darán inicio al ciclo sexual (Daval, 2000). La edad a la que las perras alcanzan la pubertad es muy variable. La raza es un factor determinante para la presentación del primer estro. Generalmente las perras tienen su primer celo algunos meses después de alcanzar su peso y tamaño adulto, lo que ocurre entre los 6 y 10 meses de edad en las razas pequeñas y entre los 18 y 24 meses en las razas grandes (Daval, 2000; Esquivel, 2002).

Los aumentos cíclicos y disminuciones en FSH y LH, a su vez, controlan los cambios ováricos cíclicos, lo cual, es responsable de los eventos fisiológicos en el ciclo reproductor normal de la perra (Allen, 1992; Davol, 2000; Ruckebusch *et al.*, 1991).

El ciclo estral de la perra presenta ciertas particularidades a diferencia del ciclo de otras especies domésticas, por lo tanto el conocimiento de las características reproductivas de esta especie es muy importante para optimizar la producción de cachorros (Esquivel, 2002).

La historia de ciclos estrales anteriores de una perra, ayudará a conocer sus variaciones normales (Purswell y Parker, 2000), aunque el momento de la ovulación puede no ser constante durante los celos sucesivos en la misma perra (Allen, 1992).

La perra ha sido clasificada como una hembra monoéstrica ya que presenta un periodo de aceptación sexual en la época reproductiva y en promedio presenta dos celos al año con un intervalo de 6 meses aproximadamente pudiendo variar de 4 hasta 12 meses dependiendo de la raza (Davol, 2001; Esquivel, 2002).

Ruckebusch (1991), clasifica el ciclo estral en dos fases:

- a) *Fase folicular*: que incluye el proestro y el estro.
- b) *Fase lútea*: que comprende el metaestro y el diestro.

El ciclo reproductivo normal de la perra comprende las cuatro fases: proestro, estro, diestro, y anestro (Davol, 2000), aunque hay autores que consideran una fase de metaestro (Foster y Smith, 2001), como lo cita Ruckebusch (1991).

3.1.2.1. Etapas del ciclo estral

a) Proestro

También conocido como la fase folicular (Davol, 2000). Se considera como el inicio del ciclo estral (Esquivel, 2002). En el ciclo normal de la hembra canina, el

proestro tiene una duración de 7 a 9 días (Foster y Smith, 2001; Allen, 1992), aunque hay quien sostiene que normalmente dura de 2 a 21 días (Stornelli *et al.*, 2001; Esquivel, 2002; Purswell y Parker, 2000), y quien afirma que tiene una duración media de 9 días con un rango de 3 a 17 días (Davol, 2000), por lo que se exige flexibilidad para acomodar estas grandes variaciones.

El principio de la fase del proestro lo indican, la inflamación de la vulva, el tejido externo de la apertura vaginal, y las marcas de la descarga sanguinolenta (Allen, 1992; Davol, 2000; Foster y Smith, 2001), resultado de una diapedéisis y de una ruptura capilar subepitelial del endometrio (Esquivel, 2002). La descarga sanguinolenta puede no verse en algunas perras porque la eliminan lamiéndose, también es difícil de identificarla en hembras de pelo largo, y en perras de color negro no se aprecia (Allen, 1992; Esquivel, 2002). La presentación del proestro se puede predecir en algunas perras por cambios en su pelaje (Allen, 1992).

En algunos casos la vulva puede inflamarse varios días antes del inicio de la descarga sanguinolenta, y es posible también que las perras atraigan a perros varias semanas antes del inicio de ésta descarga (Purswell y Parker, 2000), ya que los perros pueden detectar las feromonas asociadas con elevaciones de estrógeno antes del inicio del proestro clínicamente aparente (Purswell y Parker, 2000; Foster y Smith, 2001). La emisión de orina en el proestro es más frecuente (cantidades pequeñas) para diseminar las feromonas, la perra resulta atractiva para los machos aunque generalmente no permitirá la monta (Allen, 1992; Esquivel, 2002).

En esta etapa hay crecimiento folicular, la Hormona Folículo Estimulante (FSH), es la responsable, bajo su influencia el folículo en desarrollo empieza a secretar estrógenos (Esquivel, 2002). Las cantidades crecientes de estrógenos, secretadas por los folículos ováricos, causan que las células de las paredes vaginales tomen una forma distintiva, éste es un proceso conocido como cornificación (Davol, 2000). Las concentraciones de estrógenos en suero son bastante altas durante dos meses antes del inicio de la descarga sanguinolenta (Purswell y Parker, 2000).

Ambos el nivel de estrógenos y la cornificación vaginal son indicadores útiles de proestro (Davol, 2000).

b) Estro

La palabra estro deriva del griego *oistros* que significa deseo manifiesto (Esquivel, 2002). Tiene una duración media de 9 días (Allen, 1992; Davol, 2000), con un rango de 3 a 21 días (Davol, 2000; Esquivel, 2002), por lo tanto resulta difícil establecer un patrón estándar para todas las perras. La receptividad a la monta (apareamiento) marca el principio de la fase del estro (Allen, 1992; Davol, 2000; Esquivel, 2002; Purswell y Parker, 2000), y éste finaliza cuando la perra rechaza la monta (Allen, 1992; Esquivel, 2002). En promedio, las perras aceptarán al macho en los días 9 ó 10 y dejarán de aceptarlo en los días 16 ó 17, considerándose que día 1 se refiere al primer día de descarga sanguinolenta (Purswell y Parker, 2000).

Los signos clínicos, además de que la hembra se torna receptiva al macho, son cambios de comportamiento, contrae la región perineal al contacto con el macho y se queda quieta apoyándose en sus extremidades para facilitar la penetración. También existen algunos signos físicos, la vulva se torna flácida, la secreción vaginal puede continuar (Esquivel, 2002). El flujo puede ser menos copioso y menos hemorrágico que en el proestro, aunque este no es un hecho constante, es decir algunas perras presentan un flujo escaso durante el proestro y estro, mientras que otras tienen un flujo sanguinolento abundante que persiste en esta etapa (Allen, 1992).

Fisiológicamente, el estro coincide con la presencia predominante de las células cornificadas epiteliales vaginales, con un aumento en el nivel de progesterona sérica a 2 ng./ml. (Davol, 2000), y con una disminución en los niveles de estrógenos (Esquivel, 2002).

Para realizar la cruce por monta natural es mejor llevar la perra al lugar donde se encuentra el perro debido a consideraciones territoriales. Las perras se sentirán menos dominantes fuera de su territorio de casa, y los perros deben ser más dominantes que las perras para que las perras permitan la cópula. Perras

dominantes (alfa) no permitirán la cópula de perros menos dominantes (beta) (Purswell y Parker, 2000).

Una vez que ha iniciado la conducta de caballete (aceptar al macho) la cruce debe ocurrir cada dos o tres días hasta que la perra ya no acepte al perro (Purswell y Parker, 2000). Sólo durante los 3 a 7 días del estro la perra estará en la fase apropiada para quedar preñada (Foster y Smith, 2001). Tradicionalmente, las perras eran cruzadas el 14^{avo} día después del inicio del proestro. Esto porque fue observado que la mayoría de las perras exhibía "señales con la cola" (desviación lateral de la cola con elevación de la vulva). Después, cuando se adoptó la norma para realizar uniones múltiples, la perra se apareaba en los días 12 y 14 (para el servicio doble), o en los días 11, 13, y 15 (para el servicio triple) (Davol, 2000).

Aunque éstas reglas son adecuadas para asegurar una cruce óptima y tamaño de camada en la perra promedio, no todas las perras ovulan el día 12 de inicio del proestro. Algunas pueden ovular en el día 5 o tan tarde como el día 25, en tal caso utilizando esta regla resultará un fracaso el momento de apareamiento (Allen, 1992; Davol, 2000).

c) Metaestro

Para muchos autores ésta etapa del ciclo estral no está considerada en la hembra canina, pero Foster y Smith (2001) afirman que después de 3 a 7 días de estro, la perra pasa a la etapa de metaestro, que no prolonga la fertilidad, y no aceptará al macho. Sin embargo Allen (1992), considera al metaestro y al diestro como una misma etapa, la cual abarca la mayor parte de la fase luteínica de la perra. Esta etapa comienza cuando la perra rechaza la monta por primera vez; la vulva aparece gradualmente menos tumefacta y puede desarrollarse un flujo vulvar mucoide como en la gestación; su duración es de 60 días y termina cuando las concentraciones de progesterona circulante son mínimas (Allen, 1992).

Por otro lado, mientras los términos metaestro y diestro han sido utilizados para referirse a la fase lútea del ciclo desde el punto de vista clínico tenemos lo siguiente:

- *Metaestro* se refiere al período de luteinización temprana de los folículos, que en el caso de la perra se presenta durante la fase final del proestro.
- *Diestro* se refiere al período del funcionamiento del cuerpo lúteo.

En base a lo anterior no se habla de un metaestro en la perra ya que los eventos característicos del metaestro (fase lútea) se presentan mientras la perra sigue en estro (antes de la ovulación), por lo tanto en la perra, sólo se le considera al diestro como la etapa de influencia progestacional ya que el metaestro se superpone con el estro (Esquivel, 2002).

d) Diestro

Tiene una duración media de 2 meses (Davol, 2000), pero hay quien sostiene que en la hembra que no está preñada su duración promedio es de 100 días (Esquivel, 2002). Aproximadamente 6 días después de la ovulación, las células epiteliales cornificadas vaginales se revertirán a un estado no cornificado. Esta condición marca el principio del diestro (Davol, 2000). También se puede considerar que comienza el primer día en que la perra no acepta al macho (Esquivel, 2002).

Dentro de los signos clínicos del diestro figuran:

- La hembra rechaza la monta del macho.
- La hembra ya no atrae a los machos.
- La vulva regresa a su tamaño normal (tamaño anebral), desapareciendo la flacidez y la secreción (Esquivel, 2002).

Después de la ovulación, continúa el desarrollo del cuerpo lúteo dentro de las cavidades foliculares y por lo tanto, la concentración de progesterona sigue elevándose, alcanzando su pico 20 a 30 días postovulación o bien 2 a 3 semanas

después del inicio del diestro y se mantiene en una concentración de 15 a 60 ng./ml. aproximadamente, por 1 ó 2 semanas (Esquivel, 2002). Tanto en las perras gestantes como en las no gestantes, los niveles de progesterona son muy similares en esta fase. El diestro termina cuando el nivel de progesterona decae a menos de 1 ng./ml. (Davol, 2000). Esto sucede a los 63 días en las hembras preñadas para la presentación del parto, y a los 100 días en las hembras no gestantes (Esquivel, 2002), aunque Davol (2000), afirma que en las hembras no gestantes los niveles de progesterona disminuyen aproximadamente dos meses después de la ovulación.

e) Anestro

El anestro se define como el tiempo que transcurre entre el final de la fase lútea (diestro en perras vacías ó gestación en perras gestantes), y el principio de la fase folicular (proestro) (Esquivel, 2002), es decir, el principio de esta fase es marcado por el descenso del nivel de progesterona sérica a menos de 1 ng./ml., y la aparición del sangrado preestral indica el final de esta fase (Davol, 2000).

El inicio del anestro en perras que no quedaron gestantes es difícil de detectar, ya que no existe un cambio claro entre la finalización del diestro y el inicio del anestro, es decir, no hay diferencia clínica entre la perra diéstrica y la perra anéstrica (presentan los mismos signos). En cambio en las perras gestantes es evidente que el parto marca la demarcación entre gestación (diestro) y el inicio del anestro (Esquivel, 2002).

El anestro constituye un período de inactividad ovárica (Allen, 1992; Esquivel, 2002). Tiene una duración media de 4 a 4.5 meses (Allen, 1992; Davol, 2000), pero hay citas de que dura de 4 a 7 meses si la perra cicla dos veces al año, y de 9 a 11 meses si cicla una sola vez (Esquivel, 2002).

Esta duración puede variar de 1 mes a 2 años, ya que se ve influenciada según Allen (1992) por:

- *Época del año*: algunas perras tienen la tendencia primitiva de un período de proestro/estro por año, por ejemplo la raza Basenji; mientras que en

otras razas muchas hembras pueden iniciar la fase proestro/estro durante la primavera con preferencia a otra épocas del año.

- *Feromonas*: las perras que se mantienen juntas suelen mostrar la fase proestro/estro en la misma época; se cree que los olores de una perra en fase de estro pueden estimular a otras.
- *Factores desconocidos*: sigue siendo un misterio la señal que pone en marcha el desarrollo folicular en la mayoría de las perras.

Durante el anestro ocurre la involución uterina postparto o bien la preparación del útero para el siguiente ciclo (Esquivel, 2002).

IV. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE ESTRO

En términos endocrinos, el período fértil (estro), se ha definido cuando los estrógenos disminuyen, la progesterona aumenta y el pico de LH aparece lo que resulta difícil de detectar, dando como resultado la constante confusión de creer que la fertilidad inicia cuando la perra acepta la monta, que no siempre ocurre. Por lo tanto, se deben implementar otras alternativas como; la citología vaginal exfoliativa, la vaginoscopía, el draminsky, para detectar el momento óptimo para realizar la cruce o la Inseminación Artificial (Esquivel, 2002).

4.1. Citología Vaginal

Es una técnica utilizada para determinar en que etapa del ciclo estral se encuentra la perra y principalmente el momento más adecuado para realizar la monta natural o la Inseminación Artificial. La ovulación ocurre al inicio del estro y por lo tanto, es importante identificar esta etapa. También ayuda a detectar patologías del aparato reproductor femenino (Hutchison, 2001; Esquivel, 2002).

4.1.1. Fundamento de la citología vaginal exfoliativa

El principio de la citología vaginal exfoliativa se basa en identificar el tipo y cantidad de células de las diferentes etapas del ciclo estral, ya que los cambios hormonales que sufre la vagina durante el ciclo se reflejan en la morfología de sus células epiteliales. Al inicio del ciclo, la célula epitelial recibe una mayor irrigación sanguínea (nutrición celular). Conforme los niveles de estrógenos se incrementan el epitelio vaginal se va engrosando ocasionando que la célula epitelial se vaya separando del aporte sanguíneo, dando como resultado una transformación celular que va de célula parabasal a célula anucleada o escama (Esquivel, 2002). Los practicantes de la citología vaginal deben entender por que ocurren los cambios citológicos y lo que indican estos cambios (Purswell y Parker, 2000).

4.1.2. Clasificación de las células vaginales

En cuanto al tipo de células vaginales estas se clasifican según Esquivel (2002), en:

- a) *Célula parabasal*: Es una célula grande de forma oval o redonda con núcleo aparente y pequeña cantidad de citoplasma. Esta célula se desprende de la capa de células germinales cercana a los vasos sanguíneos y predomina en el anestro y principios del proestro.
- b) *Célula intermedia*: Es una célula grande de bordes irregulares con núcleo más pequeño o más grande que la parabasal pero con mayor cantidad de citoplasma. La presencia de esta célula indica la etapa anterior a su transformación a superficial, predomina a la mitad del proestro.
- c) *Célula superficial*: es una célula pequeña, de bordes angulosos, con núcleo de menor tamaño que las anteriores. Es característica del final del proestro

y todo el estro, que es cuando la vagina se encuentra bajo la influencia del pico estrogénico.

- d) *Célula anucleada*: También se le conoce como escama, es una célula pequeña, sin núcleo, de bordes angulosos e irregulares que predomina en el estro y marca el final del proceso de descamación de la célula parabasal.

4.1.3. Tipos de células presentes en cada fase del ciclo estral

4.1.3.1. Proestro

Debido a la elevación de la estrogenemia en el proestro, el número de capas celulares del epitelio vaginal aumenta. Este hecho hace que las células lumbales se alejen de la irrigación sanguínea evolucionando hacia la muerte. Este fenómeno podrá visualizarse claramente en los extendidos vaginales en los cuales aumentará el porcentaje de células superficiales (cornificadas) a medida que se acerca el fin del proestro y el comienzo del estro (Jhonston *et al.*, 2001).

4.1.3.2. Estro

Bajo la influencia de estrógeno, el epitelio vaginal engruesa de 20 a 40 capas de células. Este espesor protege la vagina durante la cópula. Cuando el epitelio vaginal espesa, la citología vaginal exfoliativa muestra el cambio de células no cornificadas a células cornificadas del epitelio. Cuando las células cornificadas del epitelio predominan, la perra o está en proestro (Purswell y Parker, 2000), o estro (Davol, 2000; Purswell y Parker, 2000) .

El epitelio vaginal que ha aumentado de grosor bloquea la migración de neutrófilos al lumen vaginal. Raramente, una perra normal presenta neutrófilos en citología vaginal durante el estro (Purswell y Parker, 2000).

4.1.3.3. Diestro

El valor de la citología vaginal se sobrestima a menudo en el manejo reproductivo, pero hay un hallazgo absoluto en citología vaginal que indica el inicio

del diestro. La citología vaginal cambia abruptamente y dramáticamente durante 24 a 48 horas de un predominantemente modelo de células cornificadas a un modelo de células no cornificadas. Los neutrófilos están presentes en números grandes. El primer día de este cambio citológico dramático es llamado día 1 del Diestro o D1. Esta información es valiosa porque puede usarse para predecir la duración de la gestación. Las perras paren 56 o 57 días típicamente después del inicio del diestro citológico (Purswell y Parker, 2000).

4.1.4. Técnica de citología vaginal exfoliativa

Para tomar una muestra de citología vaginal se introduce un hisopo estéril por la comisura dorsal de los labios vulvares (previa limpieza de estos). Se debe hacer suavemente hasta atravesar el cingulum (unión vestíbulo - vaginal) para llegar a la porción caudal de la vagina, en la cual, mediante movimientos rotatorios del hisopo, se colectará el material celular. Hecho esto, se retira el hisopo y se hace un frotis por rodamiento sobre un cubreobjetos, se fija en alcohol al 95 % durante 5 a 10 minutos y se tiñe para observarla al microscopio. Existen técnicas de tinción como la de Papanicolau, Diff-quick, Giemsa, Wright y Shorr que pueden ser utilizadas para teñir muestras de citología vaginal, de las cuales la técnica de Shorr se describe a continuación (Esquivel, 2002) :

- 1.- Se lava el exceso del fijador con agua corriente.
- 2.- Hematoxilina de Harris por 30 seg.
- 3.- Enjuague con agua corriente por 5 minutos.
- 4.- Colorante de Shorr por 1 minuto.
- 5.- Enjuague con agua corriente.
- 6.- Alcohol al 70 % por 30 seg.
- 7.- Alcohol al 95 % por 30 seg.
- 8.- Alcohol absoluto por 30 seg.
- 9.- Xilol por 1 minuto.

4.2. DRAMINSKY

4.2.1.MANUAL DE USO DEL DETECTOR DE OVULACION DE DRAMINSKI

Uno de los elementos más esenciales en el organismo de los animales de crianza es detectar el momento de la ovulación. Esta es la mayor importancia para la eficiencia de una hembra que será montada.

El apareamiento efectivo dependerá de haberse hecho en el momento exacto. Así pues, en la búsqueda de algo seguro y de un método simple de usar es la detección de la ovulación. Científicos y criadores de animales han determinado una interdependencia directa entre los cambios de la resistencia eléctrica del moco vaginal y la presencia de la ovulación.

En el curso y la búsqueda las propiedades del moco vaginal los científicos han determinado que cual mas cercana a la ovulación, hay mas cambios en la resistencia eléctrica del moco vaginal.

Conociendo la fisiología animal, en particular cuando los cambios ocurren en el ciclo del estro, han permitido entender a la ciencia la correlación de los cambios que ocurren en los ovarios y los cambios en la resistencia del moco en el vestíbulo vaginal de las perras.

Todos estos fenómenos mencionados y la interdependencia de la resistencia eléctrica durante la ovulación han sido usados como ventaja por draminsky, construyendo el detector eléctrico para la ovulación de perros.

4.2.2.DESCRIPCIÓN

El detector electrónico consiste en pruebas de sondeo. Una pantalla digital donde tomara las lecturas y el mango con el switch de on y off. Una batería común de 9V que será colocada en el mango. Dos anillos paralelos (electrodos) serán encontrados al final de la sonda. Son los responsables de medir la resistencia eléctrica del moco vaginal encontrado en el vestíbulo o entrada vaginal. (fig.1,2.



(fig1)



(fig2)

La magnitud de corriente eléctrica que fluye sobre estos electrodos, así como el campo eléctrico creado por estas mini corrientes, son absolutamente inofensivas para el animal y personas.

El cuerpo del detector esta fabricado por polipropileno, que es resistente a agentes atmosféricos y a muchos químicos. El instrumento es a prueba de humedad, así permite que la unidad se fácil de mantenerla limpia y en una condición higiénica.

4.2.3.OPERACION

El switch de on y off debe ser presionado y apretado mientras sean tomadas las lecturas (mediciones). El switch debe apagarse inmediatamente para conservar el poder de la batería, cuando el switch se ponga en on el instrumento debe estabilizarse en 1.5 o 2 segundos. Mientras esto suceda un numero escogido al azar o los números que están en exhibición son seguidos de los dígitos "1 0", indican que la batería esta conectada y el instrumento funcionando, pero no que las lecturas en sido tomadas.

Cuando se encuentre en uso: después de introducir la sonda, el switch del detector debe estar presionado y las lecturas serán tomadas después de un periodo de unos segundos de estabilización.

Las unidades indicatoras mas bajas son 10 unidades mientras el rango mas alto es de 0-1990 unidades. Cuando el limite mas alto excede de los dígitos "1 0", la

pantalla estará indicando un exceso. Como en el caso cuando el switch a sido puesto en on al aire.

Antes de usar asegúrese que los electrodos están limpios. La contaminación con aceite para la piel durante la exanimación o el manejo puede dar resultados o lecturas incorrectas. Limpiarlo siempre antes de usarlo, no importa que este nuevo.

4.2.4 FAMILIARIZACION

Antes de usar el detector electrónico por primera vez cheque:

- 1.- tome algunas lecturas de un número de hembras que estén en celo definitivo.
- 2.- tome algunas lecturas en algunas hembras que no estén claramente en celo.

La diferencia entre la lectura del paso uno y el paso dos ayudara al usuario novato a conseguir o sentir la función y a orientar al usuario de las diferencias entre determinados animales.

El funcionamiento del detector puede ser probado en condiciones de laboratorio como sigue:

Ponga la sonda en una vasija que contenga agua limpia y tome la lectura. Esta lectura también deberá ser un muy alto "1 0" indicando una sobre carga a la resistencia del agua generalmente y altamente tranquila. En la práctica esto no ocurre como en la resistencia del moco vaginal que es mas bajo que el máximo rango del detector.

Después agregue una pisca de sal al agua y revuelva bien. Sumerja la sonda y tome la lectura ahora el resultado es mucho mas bajo con la sal que baja la resistencia eléctrica de la solución. (menos resistencia = menor lectura).

Adicione otra pisca de sal y bajara la lectura antes tomada.

Este simple experimento nos muestra la función del detector también como un fenómeno anormal caído en las lecturas como resultado de que hay orina presente en los electrodos y que la orina contiene sal.

4.2.5. MEDIDAS

Antes de tomar una lectura siga los sig. Pasos:

- 1.- cheque la función eléctrica del detector al aire para asegurarse de que las baterías tienen la carga necesaria, (la pantalla mostrara los números "1 0")

2.- prepare un desinfectante para esterilizar la sonda como se indica en la desinfección.

3.- si el área de la vulva esta sucia, lávela, limpie y seque.

4.2.6.TOMANDO UNA LECTURA

Para hacer el proceso mas fácil (sobre todo en perros pequeños), es conveniente subir a la perra en una mesa o en una superficie conveniente mente estable.

1.- inserta la sonda

2.-presione el switch on-off y presione por unos segundos mientras la pantalla del lector se estabiliza. Después de haber tomado nota suelte el switch.

Algunas lecturas deberán ser tomada a la primera introducción de la sonda de acuerdo a la experiencia en el procedimiento para asegurar la consistencia y lecturas precisas obtenidas.

3.- remueva con cuidado la sonda.

4.- desinfecte como se indique en la sección de desinfección y acomode en su estuche.

4.2.7.INSERTANDO LA SONDA

Exponga la vulva con cuidado para facilitar la entrada de la sonda inserte aproximadamente 8 cm. Tomando en cuenta la raza, tamaño etc..... Mientras la resistencia es tomada en el cuello del cérvix. (ver figura 1.1)



(figura 1.1)

No es muy común en algunas perras estar totalmente dilatadas así como puede que la resistencia no se evidente. En esta área, justamente antes del cuello del cérvix donde la concentración de moco es mas alta, y que es donde el detector necesita llegar.

4.2.8. PARA OBTENER UNA MEDIDA O LECTURA

Por favor tome nota: en razas grandes puede ser necesario insertar la sonda un poco mas para alcanzar el moco vaginal y obtener una lectura buena.

- Es necesario insertar la sonda en un ángulo correcto al vestíbulo vaginal. (es aproximadamente entre 25 y 45 grados). Este angulo puede variar de acuerdo al tamaño e individualidad de cada raza y no escomun mente que el angulo sea tan inclinado. La sonda devera insertarse casi vertical. Usando el angulo de insercion correcto, lo ara mas fasil de entrar no molestando a la perra.
- Con la sonda insertada con la profundidad requerida, rote la unidad completa casi360 grados, asi los electodos entraran de lleno en contacto con el moco vaginal.

Las lecturas pueden ser tomada directamente con la sonda desde lo mas alto asta lo mas bajo del perímetro del cervix o directamente de los lados de

los cuernos del cérvix (imaginando como si estuviera frente a un reloj y las manecillas a las 11 y 1 de este)

- Permitir algunos momentos para que la sonda alcance la temperatura corporal de la perra para asegurar unas lecturas precisas y después sin quitar la sonda, tome algunas lecturas en posiciones diferentes como previamente se tomaron como promedio los resultados.

Es necesario que antes de cualquier lectura, la unidad se rote 360 grados para obtener con la sonda moco fresco.

En ese momento preciso y con lecturas consistentes obtenidas y con cualquier registro de lectura, donde el moco no ha sido recogido una muestra puede ser descartada.

No es muy común para algunas perras proveer diferentes sets de lecturas cuando los muestreos son tomados por las mañanas y en la tarde. por ejemplo.

Como siempre se puede ver en el perfil trazado por la progresión en las lecturas, que serán las mismas para ambas mañanas o tarde, considerando el valor actual de las lecturas.

4.2.9. DESINFECCION

Antes y después de cada muestreo debe ser desinfectado, cuidadosamente y minuciosamente limpiar las y la desinfección del instrumento es una de las partes más importantes. (ver figura 1.2)



(figura 1.2)

4.2.10.CONDICIONES PARA UN USO ADECUADO

Se recomienda limpiar la sonda con una gasa, algodón o con una toalla de papel para limpiar el moco, heces, orina y pelo, especial mente alrededor de los electrodos.

Lo siguiente es mejor lavar dejando correr el agua y final mente sumergir en una solución desinfectante adecuado para evitar irritación vaginal

En algunas perras el pico puede estar 400 unidades mientras en otras el pico puede estar en 600 o en 750 0 hasta 1000, pero es importante

recordar que el trazo del perfil es importante y no el valor actual de la lectura.

Se recomienda seguir las sig. interpretaciones de las sig. Lecturas:

Si las lecturas están entre 100-200 unidades, no se necesita tomar muestreos diarios.

Cuando las lecturas anden cerca de 200, las lectura o muestreos deben ser tomados diarios.

Algunas veces las lecturas pueden pasar algunos días y después mostrar dinamicos incrementos.

Cuando las lecturas empiezan a elevarse es advertible que se tomen lecturas mas frecuente mente como dos, tres, cuatro veces mas al dia para determinar el punto presiso de ovulación. Así las lecturas pueden tomarse durante el desayuno, almuerzo o cualquier hora. Esto es precisamente importante en el caso de perra que ovulan tempranamente o solo por un limite de tiempo para que acepte al perro.

Después del pico de lectura es el tiempo ideal de cruza

4.3. Vaginoscopía

La vaginoscopía es un diagnóstico más preciso para el manejo reproductivo en perras que la citología vaginal. Bajo la influencia del estrógeno, los pliegues vaginales se inflan, humedecen, y ruborizan. Conforme avanza del proestro al estro, estos pliegues empiezan a perder su apariencia hinchada y se arrugan.

Cuando la perra esta por completo en estro, los pliegues vaginales tienen arrugas pronunciadas con bordes bien definidos. Conforme la perra avanza del estro al diestro, los pliegues vaginales se aplanan, y la mucosa vaginal asume una apariencia rayada roja y blanca. La vaginoscopía es fácil de hacer y puede hacerse en una perra despierta, sin tranquilizarla. Pueden usarse Proctoscopios o endoscopios, flexibles o rígidos. El calibre debe ser de 8 a 15 mm de diámetro y por lo menos 10 a 20 cm de longitud con una fuente de luz adecuada. Usted puede usar la vaginoscopía con o en lugar de la citología vaginal (Purswell y Parker, 2000).

Normalmente, el epitelio vaginal son sólo unas capas gruesas de células y es susceptible a lesión, incluso por el toque más ligero. Esto está demostrado por el hecho de que las hemorragias petequiales son comunes cuando se han realizado vaginoscopías, aún cuando la perra no se encuentra en proestro ó estro (Purswell y Parker, 2000).

V. DETECCIÓN DE LA OVULACIÓN

La ovulación es el proceso mediante el cual el folículo alcanza la superficie del ovario y se rompe, liberando un óvulo (Davol, 2000). La perra es única cuando se compara a otros animales domésticos ya que ovula estando presente progesterona en su organismo, contrario a otras especies que requieren de estrógenos para ovular (Hutchison, 2001; Esquivel, 2002). Además la perra ovula un huevo inmaduro que requiere una división meiótica extensa antes de que pueda ser fertilizado. Todo este proceso tiene lugar en un ciclo estral que promedia 21 días de los que el periodo fértil es de aproximadamente 72 horas (Morton, 1986; Allen, 1992; Hutchison, 2001).

5.1. Métodos de Diagnóstico de la ovulación

5.1.1. Señales fisiológicas.

La suavidad de la vulva y el color de la descarga vulvar han sido utilizados con frecuencia para determinar el tiempo apropiado para aparear una perra con

éxito, ya que la suavidad de la vulva, indica el inicio de la ovulación (Davol, 2000; Hutchison, 2001). Utilizar la conducta receptiva de la hembra como un indicador de la ovulación, y determinar así el tiempo de apareamiento tiene muchas limitantes, porque estos signos no siempre son claros. Mientras algunas perras pueden presentar un proestro sin signos, (sin mostrar ninguna señal exterior de descarga sanguinolenta, etc.) lo cual dificulta el estimar la fecha exacta de ovulación, otras, por el contrario pueden ser receptivas a los machos a lo largo del proestro, o pueden permanecer involuntarias para el apareamiento incluso en el momento de la ovulación. Las diferencias observadas de perra a perra con respecto a señales y conducta de apareamiento, así como el hecho de que un error producirá 6 meses o más de espera para intentar de nuevo la reproducción de los ejemplares, son motivos suficientes para utilizar otro método más eficaz para determinar el momento de la ovulación (Davol, 2000).

5.1.2. Monitoreo de estrógeno.

El uso de estrógeno para determinar el tiempo de ovulación de la perra no es fiable debido a la singularidad del proceso ovulatorio de la perra (Hutchison, 2001).

5.1.3. Pico de la Hormona Luteinizante (LH)

Dos días antes de la ovulación, hay una ola o pico en la secreción de la Hormona Luteinizante (LH) por parte de la hipófisis. Esta ola de LH es de importancia crítica porque en su ausencia, aunque sucedan otros efectos fisiológicos hormonales, la ovulación no ocurrirá (Davol, 2000), ya que la Hormona Luteinizante de la glándula pituitaria activa la liberación de los óvulos de los folículos (Hutchison, 2001), provocando la ovulación de 36 a 50 horas después de haber alcanzado su nivel más alto (Esquivel, 2002), aunque en la

mayoría de las perras esto ocurre a las 48 horas después del pico de LH (Davol, 2000; Stornelli *et al.*, 2001).

Por lo tanto, la perra promedio experimentará la ola o pico de la Hormona Luteinizante (LH) en el Día 10 (donde Día 1 se define como el primer día de descarga sanguinolenta), ovulará en el Día 12, y por consiguiente, la concepción óptima es en el Día 14 (Stornelli *et al.*, 2001; Davol, 2000), es decir, si estimamos el día en que ocurre el pico preovulatorio de LH, dos días más tarde ocurrirá la ovulación de oocitos primarios, los cuales madurarán en aproximadamente 48 horas después de haber sido ovulados, para poder entonces ser fertilizados (Stornelli *et al.*, 2001).

Por otro lado, la ola de la Hormona Luteinizante (LH) causa en las células ováricas el cambio de secreción de hormona progesterona en lugar de estrógeno. Hay un aumento como resultado, en nivel de progesterona, y una disminución en niveles de estrógeno. Este fenómeno marca la transición de la fase folicular a la fase lútea y tiene una duración de 1 a 3 días (Davol, 2000; Esquivel, 2002).

5.1.3.1. Pruebas para la determinación de los niveles de Hormona Luteinizante

Al contrario de la concentración de progesterona que continúa aumentando, la LH alcanza su pico en un periodo de 12 a 24 horas (Davol, 2000; Hutchison, 2001), y después disminuye rápidamente. Por lo que, aún haciendo pruebas diarias, es posible pasar por alto la ola de LH (Davol, 2000).

5.1.3.1.1. Prueba de orina

La prueba de orina para determinar los niveles de LH es infructuosa debido a la necesidad de coleccionar la primera orina de la mañana de la perra y al hecho de que LH se metaboliza en fragmentos diferentes, algunos son perceptibles en la orina por pruebas comerciales, mientras otros no (Hutchison, 2001).

5.1.3.1.2. Prueba en suero

Se ha utilizado con éxito la prueba en suero para determinar los niveles de LH, para el diagnóstico de la ovulación. Pero la corta duración de la Hormona

Luteinizante (LH) en el torrente sanguíneo, requiere que la prueba se practique diariamente, en lo que se pierde tiempo y puede ser incómodo para el paciente (Davol, 2000; Hutchison, 2001).

5.1.4. Aumento de Progesterona.

Al final de la fase de proestro, el nivel de Hormona Luteinizante (LH) aumentará. Esta ola de LH coincide con un aumento en el nivel de progesterona (Davol, 2000). Por consiguiente, la descarga de progesterona por parte del ovario y su elevación subsecuente a un promedio de 2 a 3 ng./ml. señala la liberación de Hormona Luteinizante (LH) de la glándula pituitaria, y denotan el inicio del proceso ovulatorio. La elevación de progesterona a más de 5 ng./ml. (5 a 8 ng./ml.) indica que la ovulación ha ocurrido (Hutchison, 2001).

La ovulación normalmente ocurre 2 días después del aumento de los niveles de progesterona, es por eso que supervisar los niveles de progesterona es un indicador excelente para determinar el momento exacto para realizar la Inseminación Artificial (IA) (Davol, 2000).

La prueba de ELISA para determinar los niveles de progesterona, es un predictor exacto para la ovulación. Para realizar esta prueba, se recomienda que se examinen frotis vaginales periódicamente al inicio del proestro para supervisar las células epiteliales vaginales cornificadas que están presentes como resultado del incremento del estrógeno. Cuando las células de la pared vaginal son aproximadamente 60% cornificadas, la prueba de progesterona en suero con ELISA debe realizarse (Davol, 2000). Las muestras son tomadas idealmente todos los días, (aunque cada 2 días también pueden ser utilizadas), y pueden ser de sangre entera o suero (dependiendo del equipo de la prueba a utilizar) (Davol, 2000; Hutchison, 2001). Se agrega la muestra a un indicador de la prueba que se ha tratado con anticuerpos monoclonales específicos para progesterona, y se determinan los resultados. Sin embargo, las limitaciones a la sensibilidad de la prueba ELISA a veces pueden producir resultados falso-positivos y falso-negativos. Esto es porque la prueba no es exacta para determinar los niveles de progesterona sérica en el rango de 1.5 a 3.0 ng./ml., y este es el rango de

concentración de importancia para determinar la ola de LH. La prueba de ELISA tiene mayor exactitud en el rango de más de 5.0 ng./ml. Por lo tanto se corre el riesgo de que una prueba indique un nivel "promedio" de progesterona (y pensemos en la ola de LH), pero puede indicar un nivel "bajo" de progesterona cuando se toma el próximo día. Esto sugiere que la prueba anterior es un falso-positivo porque una vez que el nivel de progesterona aumenta, debe permanecer elevado y seguir aumentando a lo largo de la ovulación, por consiguiente, para reducir el error debido a falsos-positivos, se debe realizar la prueba dos días consecutivos para su comprobación, antes de establecer el momento de la cruce o de la Inseminación Artificial (Davol, 2000).

La liberación de cortisol debe ser considerada cuando se hacen pruebas de progesterona en perras estresadas, ya que pueden tener un periodo prolongado entre un aumento de 2 a 3 ng./ml. y el tiempo que la progesterona sube a más de 5 ng./ml. (Hutchison, 2001).

5.1.5. Citología vaginal

La citología vaginal no es exacta para determinar el inicio de la ovulación o el tiempo óptimo de apareamiento (Purswell y Parker, 2000).

5.1.6. Test de ovulación BVT

El BVT ovulation test es un procedimiento semi-cuantitativo que se basa en la técnica ELISA en membrana. Mediante la lectura visual se puede determinar el nivel de progesterona en plasma o suero de perros, gatos, bovinos y equinos. El ovulation test está indicado fundamentalmente para determinar la ovulación y consecuentemente el momento

DETERMINACIÓN DEL PERÍODO FÉRTIL EN PERRAS

Los signos visibles del estro (hinchazón de la vulva, fin de la descarga vaginal) son solo indicadores aproximados del momento de la ovulación. Estos signos pueden variar en más de una semana en relación con el momento de la ovulación.

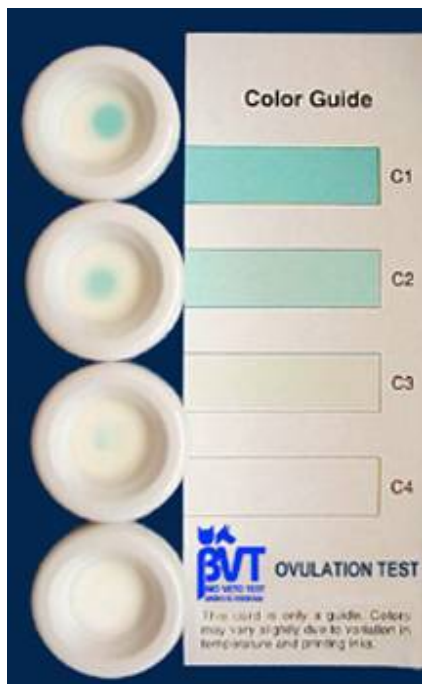
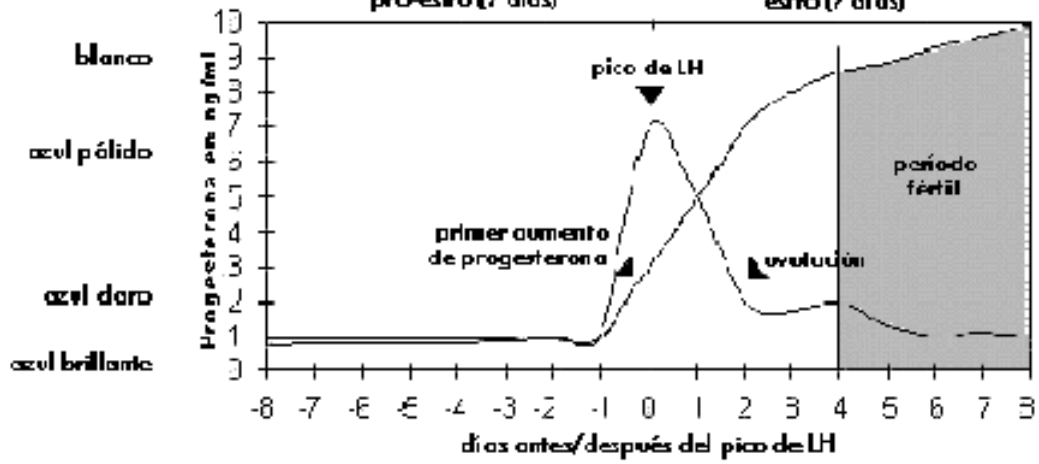
La ovulación se produce por efecto de la hormona luteinizante (LH). El día en que la LH aumenta es el día 0. La ovulación tiene lugar 2 días después de este pico de LH. Después de producida la ovulación, los ovocitos necesitan de 2 a 3 días para madurar, y los óvulos maduros viven de 48 a 72 Hs. Por lo tanto, el período de mayor fertilidad en la perra será en los días 5 y 6 después del aumento de la LH. El aumento en los niveles de progesterona corresponden con el pico de LH, por lo tanto su dosaje nos permitirá precisar el momento de la ovulación con relativa exactitud.

De acuerdo con la figura 1, los niveles de progesterona son bajos antes de la ovulación (entre 0 y 1 ng/ml, test azul brillante). Cuando la progesterona comienza a aumentar, el color del test cambia de azul brillante a celeste. Este color corresponde al pico de LH (día 0). Los niveles de progesterona continúan aumentando los días siguientes y el color del test se torna celeste pálido y luego blanco.

La preñez solo será posible si los óvulos están maduros(2 días después de la ovulación) y el esperma viable (5 días \pm 2). En el 20 % de las perras la ovulación se produce fuera del período comprendido entre los días 10 y 14 a partir del inicio del celo.

El primer día del celo no es preciso y la aceptación del macho no coincide necesariamente con el período fértil. De acuerdo con C.Dumont(1) únicamente dos determinaciones asociadas : frotis vaginal y test de progesterona, sirven para programar la inseminación y obtener un 95 % de éxito con un aumento de la prolificidad

El comienzo del aumento del nivel de progesterona corresponde con el pico de LH pro-estro (? días) estro (? días)



LITERATURA CITADA

1. Allen, E. 1992. Fertility and obstetrics in the dog. Oxford (England): Blackwell Scientific publications limited. p. 1-175.
2. Birchard, S. J. y R. G. Sherding. 1996. Manual Clínico de Pequeñas Especies. Tomo II, México: McGraw-Hill. p. 1044-45.
3. Brown, R. M. 1992. An update of artificial insemination with fresh, chilled, and frozen semen. Probl Vet Med. 4(3): p. 445-52.
4. Burgess, C. M., J. C. Bredl, J. M. Plummer y G. C. England. 2001. Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation. J Reprod Fertil Suppl. 57: p. 357-63.
5. Corona, C. G. 2001. Evaluación del semen. Colegio de Médicos Veterinarios Zootecnistas Profesionales en Especies Menores de la Comarca Lagunera, A.C. V Congreso Anual; 2001 Mayo 3-5; Torreón, Coahuila. México . sp.
6. Cunningham, J. G. 1999. Fisiología Veterinaria. 2° ed México: McGraw-Hill. p. 561-70.
7. Davol, P. A. 2001. Canine Reproduction. Part 4. Reproduction and the Male Dog. <<http://www.labbies.com/reproduction4.htm>> [Consulta: 10 de Agosto de 2002]
8. Davol, P. A. 2000. Canine Reproduction. Part 1: Reproduction and the Bitch. <http://www.labbies.com/canine_reproduction_table> [Consulta: 10 de Agosto de 2002]

9. Esquivel, L. C. 2002. Reproducción en Pequeñas Especies. Memoria de la XII semana de Ciencia Animal; 2002 28 Octubre - 2 Noviembre; Torreón Coahuila. México. Formato Electrónico.
10. Farstad, W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 53(1): p. 175-86.
11. Fayrer, H. F. 1996. Canine Theriogenology Notes (Male). IAM.
<<http://lam.vet.uga.edu/LAM/LM000030.HTML#VII.%20%20Sex%20hormone%20alopecias>> [Consulta: 20 de Mayo de 2002]
12. Fontbonne, A. y F. Badinand. 1993. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *J Reprod Fertil Suppl*, 47: p. 325-7.
13. Foster, R. y M. Smith. 2001. Artificial Insemination (AI). PetEducation.
<<http://www.peteducation.com/repro/AI.htm>> [Consulta: 25 de Mayo de 2002]
14. Gunzel, A. R. 1986. Sperm collection, evaluation, preservation and artificial insemination in the dog. *Tierarztl Prax*, 14(2): p. 275-82.
15. Hutchison, R. V. 2001. Canine Reproduction for Breeders, Seminar. Company at the 2001 Westminster Kennel Club Show.
16. <<http://www.amchessieclub.org/conception.html>> [Consulta: 6 de Julio 2002]
17. Iguer-ouada, M. y J. P. Verstegen. 2001a. Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology*, 55(3): p. 733-49.

18. Iguer-ouada, M. y J. P. Verstegen. 2001b. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, 55(2): p. 671-84
19. Jhonston, D. J., M. V. R. Kuztritz y P. Olson. 2001. Canine and feline theriogenology. Philadelphia (United States): Ed. Saunders. 16:287-306.
20. Linde-Forsberg, C. 1991. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 21(3): p. 467-85.
21. Linde-Forsberg, C., H. B. Strom y G. Govette. 1999. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology*, 52(1): p. 11-23.
22. a retrospective study. *Theriogenology*, 52(1): p. 11-23.
23. Linde-Forsberg, C. y M. Forsberg. 1989. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J Reprod Fertil Suppl*, 39: p. 299-310.
24. Morton, D. B. 1986. Review on the use of frozen semen in dog breeding. *Animal Technology*, 37(1): p. 67-71
25. Pena, A. y C. B. Linde-Forsberg. 2000a. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54(5): p. 703-18.
26. Pena, A. y C. B. Linde-Forsberg. 2000b. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54(6): p. 859-75.

27. Pena, A., A. Johannisson y C. B. Linde-Forsberg. 1999. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*, 52(6): p. 965-80
28. Pérez, O. A. 2001. Historia Veterinaria: Verdades y mitos sobre lo que han hecho los Veterinarios (Conclusión).
29. <<http://www.visionveterinaria.com/historia/04dic2001.htm>> [Consulta: 25 de Agosto de 2002]
30. Pinto, C. R., D. L. Paccamonti y B. E. Eilts. 1999. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology*, 52(4): p. 609-16.
31. Purswell, B. J. y N. A. Parker. 2000. Modern breeding management in dogs. *Veterinary Medicine*.
32. <<http://www.hilltopanimalhospital.com/modern%20breeding%20management.htm>> [Consulta: 29 de Septiembre de 2002]
33. Rota, A., A. Frishling, I. Vannozzi, F. Camillo y S. Romagnoli. 2001. Effect of the inclusion of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. *J Reprod Fertil Suppl*, 57: p. 377-81.
34. Ruckebusch, Y., L. P. Phaneuf y R. Dunlop. 1991. Fisiología de pequeñas y grandes especies. México, D.F.: El Manual Moderno, S.A. de C.V. p. 600-26.
35. Silva, L. D., K. Onclin, B. Lejeune y J. P. Verstegen. 1996. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet Rec*, 138(7): p. 154-7.

36. Sirivaidyapong, S., P. Ursem, M.M. Bevers y B. Colenbrander. 2001. Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl*, 57: p. 383-6.
37. Sisson, S., J. D. Grossman y R. Getty. 1993. Anatomía de los animales domésticos. 5° ed. Tomo II, México: Salvat. p. 1728-41.
38. Stornelli, M. A., M. C. Stornelli, M. S. Arauz y L. Sota. 2001. Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado. Aplicación y desarrollo en caninos. *ANALECTA VETERINARIA*, 21, 1: p. 58 –66.
39. Strom, H. B., B. Larsson, C. B. Linde-Forsberg y H. Rodriguez. 2000. Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *J Reprod Fertil Suppl*, 119(2): p. 201-6.
40. Thomassen, R., W. Farstad, A. Krogenaes, J. A. Fougner y K. A. Berg. 2001. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study. *J Reprod Fertil Suppl*, 57: p. 341-6.
41. Villalba, G. A. 1997. La inseminación artificial. Infomascota.
42. <<http://www.infomascota.com>> [Consulta: 30 de Abril de 2002]
43. Wilson, M.S. 2001. Transcervical insemination techniques in the bitch. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 31(2): p. 291-304.
44. 1993: Thesis E. DECOUVELAERE – National Veterinary School of Nantes (France)
45. 2000: Prof. TAINURIER, Dept of Reproduction Pathology, National Veterinary School of Nantes (France).