

01674



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y
DE LA SALUD ANIMAL**

**INDUCCION DE ESTRO CON OVULACION EN
PERRAS (*Canis familiaris*) PARA LA RECOLECCION
Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A
MARTHA ELENA CASTRO GUZMÁN**

ASESORES:

MPA CARLOS ESQUIVEL LACROIX

DR. OCTAVIO MEJIA VILLANUEVA

M.V.Z. MARCO ANTONIO ASPRON PELAYO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

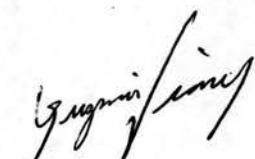
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

DECLARACIÓN

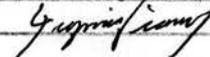
El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, de que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.


Martha Elena Castro Guzmán

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Martha Elena Castro Guzmán

FECHA: 16-Feb-2004

FIRMA: 

DEDICATORIA

Especialmente a mi Mami

Porque eres lo más valioso de mi vida y la mujer más admirable que conozco. Siempre con tu gran sabiduría me haces sentir lo hermoso de la vida, me guías y apoyas.
Te amo.

A Cynthia y Edgar

Porque con ustedes he aprendido cosas muy importantes de la vida que los adultos no pueden enseñar

A Elisa

Sé que siempre tu intención es orientarme y aunque a veces la comunicación es un poco difícil lo valoro.

A Idalia

Porque nunca olvidaré el gran apoyo que me diste en los momentos más difíciles de mi vida. Admiro tu forma de ser.

A Liliana

Gracias por tu colaboración en este trabajo. Soy afortunada por tener una hermana como tu.

A Rosalinda y Bernardo

Porque además de ser hermana y cuñado somos amigos que tenemos cosas en común. Los quiero mucho.

A Walter

Te agradezco tu amor, paciencia y enseñanzas; sin ti hubiera sido muy difícil concluir este proyecto.
TQM.

A Fernando

Aunque tu ya no estas me quedé con tus recuerdos y muchas veces han sido motivo para continuar en el camino.

A Susana

A demás de ser compañera de estudio y colaboradora de este trabajo. Te considero una gran amiga, muchas veces un ejemplo a seguir.

A Clara

Colaboradora muy profesional de este trabajo y amiga. Te agradezco tu apoyo.

A Javier

Colaborador de este trabajo, mi profesor y amigo con quien pasé momentos muy agradables. Gracias.

A Verónica y Pilar

Por tener la paciencia para enseñarme y ayudarme cuando en ocasiones sentía que estaba sola.

A Simón

Por que has demostrado ser mi amigo espero te sientas correspondido.

A Adrian

Porque contribuiste con el trabajo en un momento muy importante y eres una persona especial.

Al comité

Dr. Javier Valencia Méndez: por el tiempo dedicado a este trabajo

Dr. Marco Antonio Asprón Pelayo: porque su colaboración en este trabajo fue de gran importancia, pero a demás porque lo considero admirable como profesor.

Dr. Joaquin Aguilar Bobadilla: por el tiempo dedicado al presente trabajo.

Dr. Octavio Mejía Villanueva: por su colaboración, tiempo dedicado y aportaciones económicas.

Dr. Carlos Esquivel Lacroix: por su paciencia, orientación y porque a pesar de sus múltiples ocupaciones, en los momentos que lo necesitaba, siempre hizo esfuerzos para dedicar tiempo al presente trabajo.

Gracias por conseguir alimento para las perritas.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA	5
3.1. ASPECTOS ANATÓMICOS DE LA PERRA	5
3.2. ENDOCRINOLOGÍA DEL CICLO REPRODUCTIVO	6
3.4. FOLICULOGÉNESIS	11
3.5. OVULACIÓN Y PERIODO FÉRTIL	13
3.6. DIAGNÓSTICO DEL CICLO ESTRAL	14
3.6.A. Citología vaginal	14
3.7. DESARROLLO EMBRIONARIO	17
3.7.A. Desarrollo embrionario temprano (cigoto a mórula)	17
3.7.B. Desarrollo embrionario antes de la implantación	18
3.7.B. Implantación	19
3.8. DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN	19
3.9. MÉTODOS DE INDUCCIÓN AL ESTRO	19
3.9.A. Uso de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) o uno de sus agonistas	20
3.9.B. Uso de gonadotropinas para inducir estro	21
3.9.C. Inducción con agonistas de la dopamina	23
3.9.D. Inducción con antagonistas de la prolactina	24
3.10. INSEMINACIÓN	24
3.11. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES	25
3.11.A. Recolección de embriones	25
3.11.B. Transferencia de embriones	27
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS	30
5.1. OBJETIVOS GENERALES	30
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES	30
6. MATERIAL Y MÉTODOS	31
6.1. TRATAMIENTOS	31
6.2. SEGUIMIENTO CON PROGESTERONA	31
6.3. SEGUIMIENTO CON CITOLOGÍA VAGINAL	32
6.4. EVALUACIÓN DE LOS MACHOS	32
6.5. MOMENTO DE LA INSEMINACIÓN	33
6.6. RECOLECCIÓN DE EMBRIONES	33
6.7. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES	34
6.8. DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN	34
7. RESULTADOS	35
7.1. SEGUIMIENTO DEL CICLO INDUCIDO CON CITOLOGÍA VAGINAL	35
7.2. MEDICIÓN PLASMÁTICA DE PROGESTERONA	35

7.3.	RECOLECCIÓN DE EMBRIONES.....	36
7.4.	DESARROLLO DE LOS EMBRIONES	37
8.	DISCUSIÓN	38
8.1.	ANÁLISIS DE CITOLOGÍA VAGINAL	39
8.2.	ANÁLISIS DE PROGESTERONA EN PLASMA.....	40
8.3.	RECOLECCIÓN DE EMBRIONES.....	41
8.4.	ETAPA DE DESARROLLO.....	42
8.5.	TRANSFERENCIA.....	43
8.6.	GESTACIÓN.....	43
9.	CONCLUSIONES.....	45
10.	LITERATURA CITADA.....	46
11.	ANEXOS	54

INDICE DE CUADROS Y GRÁFICAS

1. CUADROS

Cuadro 1	54
Cuadro 2	54
Cuadro 3	54
Cuadro 4	54
Cuadro 5	55
Cuadro 6	55

2. GRÁFICAS

Gráfica 1	56
Gráfica 2	56
Gráfica 3	57
Gráfica 4	57
Gráfica 5	58
Gráfica 6	58
Gráfica 7	59
Gráfica 8	59
Gráfica 9	60
Gráfica 10	60
Gráfica 11	61
Gráfica 12	61
Gráfica 13	62
Gráfica 14	62
Gráfica 15	63
Gráfica 16	63
Gráfica 17	64

CASTRO GUZMÁN MARTHA ELENA. Inducción de estro con ovulación en perras (*Canis familiaris*) para la recolección y transferencia de embriones. Bajo la dirección del MVZ. MPA. Carlos Esquivel Lacroix; Dr. Octavio Mejía Villanueva y M.V.Z.. Marco Antonio Asprón Pelayo.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue inducir el estro fértil en perras domésticas para obtener y transferir embriones a perras receptoras con la técnica de laparoscopia. Se utilizaron 18 perras prepúberes y de hasta 2 años de edad en etapa de anestro (< 0.5 ng/ml de progesterona plasmática) y 12 machos para inseminarlas. Para la inducción del estro se administraron 20 UI de eCG /kg de peso corporal aplicadas por vía i.m. durante 5 d y una sola inyección al quinto día de 500 UI de hCG vía i.m. a cada perra. Cada tercer día se tomaron muestras de sangre para medir niveles de progesterona plasmática y citología vaginal para determinar el periodo de estro. Las perras seleccionadas para donación de embriones fueron inseminadas artificialmente cada tercer día. La inducción de proestro, basado en el edema vulvar y la hemorragia transvaginal, fue exitosa en 17 / 18 perras; de las 17 perras, 16 resultaron posteriormente positivas a estro en la citología vaginal, 11 de ellas fueron inseminadas para la recolección de embriones y 5 se dejaron sin inseminación para utilizarlas como receptoras. En el primer grupo 5 perras fueron sometidas al lavado 14 d después de la primera inseminación y el resto de las perras donadoras se lavaron 12 d después, se realizó el lavado uterino y de oviductos para obtener embriones. De las 11 perras donadoras en solo 4 fue posible recolectar 22 embriones (2 embriones de 2 células, 2 de 4 células, 1 de 8 células, 3 blástulas tempranas, 5 expandidos y 9 eclosionados) La transferencia en 3 receptoras fue realizada con el método utilizado en las borregas (laparoscopia) y 2 receptoras no pudieron recibir embriones por falta de producción en el último grupo. Ninguna perra logró gestar.

Castro Guzmán Martha Elena. Induction of fértil oestrus in female dog (*Canis familiaris*) by recolection and embryo transfer. MVZ. MPA. Carlos Esquivel Lacroix; Dr. Octavio Mejía Villanueva y M.V.Z.. Marco Antonio Asprón Pelayo.

ABSTRACT

The discovery every greater time on the reproduction attended in the domestic dog, used like scientific model, will allow in a future the practical application in canine like the Mexican wolf. The objective of the present work was to induce estro fertile in domestic dogs to obtain and to transfer embryos to receiving dogs with the laparoscopia technique. 18 dogs were used prepúberes and of up to 2 years of age in stage of anestro (< 0,5 ng/ml of plasmtic progesterone) and 12 males to insemination them. For the induction of estro 20 UI of eCG/kg of corporal weight applied by via i.m. were administered during 5 days and one single injection to the fifth day of 500 UI of hCG via i.m. to each dog. Each third day blood samples were taken to measure levels of plasmatic progesterone and vaginal cytology to determine the period of estro. The dogs selected for donation of embryos were inseminate artificially each third day. The induction of proestro, based on edema to vulvar and the transvaginal hemorrhage, was successful in 17/18 dogs; from the 17 dogs, 16 were later positive to estro in the vaginal cytology, 11 of them was inseminadas for the harvesting of embryos and 5 were let without insemination to use them like receiving. In the first group 5 dogs were put under the washing 14 days after the first insemination and the rest of the donating dogs washed 12 days later, the uterine washing and of oviductos was made to obtain embryos. Of the 11 donating dogs in single 4 it was possible to collect 22 embryos (2 embryos of 2 cells, 2 of 4 cells, 1 of 8 cells, 3 blastocyst early, 5 expanded and 9 eclosionados) the transference in 3 receiving ones was made with the used method in the lambs (laparoscopia) and 2 receiving ones could not receive embryos by lack of production in the last group. In no dog the gestation was obtained

1. INTRODUCCIÓN

Desde el siglo XVIII cuando el científico italiano Lázaro Spallanzani en 1784, informó de la primera inseminación artificial con éxito en una perra de nombre Barbet, hasta la actualidad, la tecnología reproductiva en la especie canina ha tenido avances lentos ¹. La fisiología reproductiva particular de la hembra canina no ha permitido el desarrollo de técnicas vanguardistas en la reproducción ². El área de reproducción asistida ha sido considerada como innecesaria por los investigadores debido a que los perros domésticos son altamente fértiles y comúnmente no son fuente de alimento ³, sin embargo no debemos olvidar que la perra doméstica puede ser útil como patrón biológico de aspectos reproductivos para las especies silvestres como el lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) que fue colocado en inminente peligro de extinción a partir de las campañas sistemáticas de erradicación instrumentadas contra este depredador en el Sur de los Estados Unidos y Norte de la República Mexicana durante un periodo de más de 8 años (1952 - 1960). Se calcula, por la cantidad consumida de carne envenenada, que murieron 12,400 coyotes y lobos solamente en los estados de Sonora y Chihuahua ⁴.

La utilidad potencial de los métodos para inducir el ciclo reproductivo en perras fue reconocida por Scorgie desde 1939 ⁵, desde entonces, se ha tratado de inducir estro fértil con factor liberador de gonadotropinas, gonadotropinas hipofisarias, gonadotropinas placentarias, esteroides y agonistas de la dopamina; sin embargo la mayoría de los productos para controlar el ciclo reproductivo simplemente inducen signos de estro pero no estimulan la ovulación, provocan efectos secundarios o han sido escasamente estudiados ⁶. El escaso éxito en la inducción del celo, ovulación y sincronización en la especie canina sigue siendo un obstáculo para aplicar técnicas de transferencia embrionaria ^{2, 7, 8}.

La técnica de transferencia de embriones es una herramienta para la reproducción que permite mejorar genéticamente a las especies y optimizar los recursos. Los primeros trabajos de investigaciones en mamíferos domésticos referentes a esta técnica fueron realizados en conejos por Heape en 1890. En 1934, Berry y Warwick informan el éxito en la transferencia de embriones en borregos y cabras ¹. Kvangnickii en 1951, la realiza en cerdos, y Willett en bovinos ^{9, 10}. Durante los años de las décadas de 1950, 1960 y 1970 se lograron importantes avances en las técnicas de transferencia embrionaria en las especies domésticas productivas, entre las que destaca la congelación de embriones, de la cual se obtuvo el primer ternero llamado Frosty en 1973 ¹⁰, pero considerando el tiempo que transcurrió desde la primera transferencia de embriones exitosa hasta el momento en que se realizó en perras en 1979, puede decirse que existe un retraso de 89 años ¹¹.

Takeishi fue uno de los primeros investigadores que tuvo interés en describir el desarrollo de los embriones caninos y fueron los segundos en informar de un caso exitoso en la transferencia de embriones. El interés sobre esta área también lo ha tenido Tsutsui, quien desde 1975 comenzó a investigar la duración de las etapas de desarrollo, del embrión canino ¹¹.

Se han realizado estudios para determinar el método de recolección, lugar y estado embrionario adecuado para transferir los embriones en perras, teniendo como resultado 11 perras gestantes de 21 receptoras, todas con ciclo natural ^{2, 12}, sin embargo la superovulación y sincronización, para poder optimizar la producción de cada hembra, sigue siendo un problema con escasa investigación y aun no resuelto en los caninos ³.

Los resultados con poco éxito en las investigaciones, indican la falta de conocimiento y la necesidad que existe de preparar personal necesario para llevar a cabo estudios que permitan establecer protocolos para cada una de las etapas que representa esta tecnología en vías de desarrollo. La inducción del estro, superovulación, sincronización y recolección de embriones son herramientas principales para que posteriormente se puedan realizar estudios referentes a la criopreservación y transferencia de embriones ¹.

La necesidad de manipular hormonalmente el ciclo estral en las perras con la finalidad de buscar anticonceptivos, acortar los intervalos entre estros, obtener cachorros en días predeterminados, corregir patologías como el anestro inducido por fármacos (andrógenos y glucocorticoides), anestro secundario y quistes foliculares no son las únicas causas que deben motivar al investigador para escudriñar los aspectos reproductivos de la perra doméstica; es una fuente biológica en la que debemos profundizar más para desarrollar técnicas de reproducción asistida aplicables a especies afines en peligro de extinción ¹³.

2. JUSTIFICACIÓN

En caninos domésticos las técnicas para la reproducción como la inducción al estro, superovulación, maduración *in vitro* de óvulos, fertilización *in vitro*, transferencia y criopreservación de embriones entre otras, aún están en desarrollo porque el interés en esta especie tiene su enfoque sobre el control de la natalidad, pero no se debe olvidar que los descubrimientos en un futuro favorecerán las estrategias reproductivas para la preservación de especies afines ¹⁴.

La extrema relación genética entre el perro doméstico, el lobo gris y el coyote, su habilidad para hibridarse libremente ¹⁵, y otras características reproductivas similares (citología vaginal, etapa de gestación de 63 d en perras y 66 d en lobas) ¹⁶, indica un proceso reproductivo común entre estas especies; como consecuencia puede suponerse que el éxito en las técnicas reproductivas con perros domésticos se desarrollará igualmente bien para cierto número de cánidos de la fauna silvestre en los cuales no hay población cautiva como barrera para la extinción ⁴. Entre ellos destaca el lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*) ¹⁷. El sistema canino de reproducción jerarquizada interfiere en la fertilidad de algunos individuos cuyas parejas fueron formadas sin tomar en cuenta este aspecto como es el caso de los lobos mexicanos; se deben promover investigaciones para que el aporte genético no muera con los ejemplares y de alguna forma se permita la inclusión de la diversidad genética con tecnología reproductiva, utilizando técnicas de congelación de semen, inseminación artificial, transferencia de embriones, criopreservación, nodrizas y otras que pueden ser investigadas profundamente en los perros domésticos ^{14, 18}.

Utilizar a la perra para investigar y perfeccionar las técnicas de reproducción asistida, antes de realizarlas en cánidos salvajes, ofrece una alternativa sin riesgos para las especies en peligro de extinción. Si se descubrieran los procesos fisiológicos reproductivos que estimulan la ovulación o superovulación en perras, se abriría un panorama más prometedor para los cánidos salvajes que tienen una etapa reproductiva limitada. Se debe trabajar con mucha insistencia debido al escaso conocimiento que hay al respecto y la necesidad de conservar las especies caninas silvestres ³.

La inducción del celo en la perra cobra también importancia para las personas dedicadas a la venta de cachorros, quienes saben que la demanda es por épocas, requiriendo más producción en los meses de abril, diciembre y enero. La producción y transferencia de embriones en algunos países es requerida por personas que tienen excelentes ejemplares para competencias caninas y que pretenden incrementar la eficiencia reproductiva en los animales, pero la

estimulación hormonal para la inducción del estró con ovulación, superovulación y la sincronización de la donadora con las receptoras; siguen siendo obstáculos para continuar desarrollando las demás técnicas de reproducción asistida (desarrollo de embriones *in vitro*, criopreservación de embriones y transferencia) ^{3, 17, 19}.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. ASPECTOS ANATÓMICOS DE LA PERRA

Dentro de las particularidades anatómicas de los órganos reproductivos internos de la perra se deben considerar las siguientes características:

Los ovarios son órganos pequeños, aplanados de forma oval alargada, ubicados a nivel de la tercera y cuarta vértebra lumbar. Están envueltos completamente por una bolsa peritoneal llamada bolsa ovárica, formada principalmente por grasa y músculo liso, que tiene una hendidura que se abre ventralmente²⁰, de 0.2 a 1.8 cm de largo²¹. El tamaño del ovario es en promedio de 2 cm de longitud³, pero en el periodo de proestro aumenta, alcanzando el peso y tamaño máximo en el momento de la ovulación²¹. En él ovario se observan diferentes poblaciones de folículos:

- 1) el folículo primordial de aproximadamente 25 μ de diámetro con ovocitos rodeados de una capa de células de la granulosa no diferenciadas
- 2) El folículo preantral de $78 \pm 15 \mu$ de diámetro con ovocito pequeño, claro y con múltiples células de la granulosa;
- 3) Los folículos de $115 \pm 14 \mu$ de diámetro clasificados dentro de los folículos preantrales avanzados, con un ovocito grande y con densidad citoplasmática lipídica, los folículos antrales tempranos que tienen líquido folicular con un ovocito y varias capas de células de la granulosa bien desarrolladas⁵.
- 4) Los folículos preovulatorios avanzados con una inflamación local en ápice del folículo que indica una inminente ovulación²².

Los oviductos, sostenidos por los mesosálpinx, miden de 5 a 8 cm de longitud y están formados por tres porciones: infundíbulo, ampolla e itsmo²⁰.

El útero de la perra se clasifica como bicorne; está formado por 2 cuernos, un cuerpo y un cuello²³. Los cuernos miden aproximadamente 12 a 15 cm y el cuerpo 2 a 3 cm, con un diámetro de 1 - 3 mm. El cuello es corto y más grueso que la vagina; ventralmente forma una proyección cilíndrica que asienta en una depresión de la pared vagina^{20,24}. El conducto cervical en la perra es vertical, con la abertura uterina dorsal y la abertura vaginal en posición ventral²³.

La vagina es un órgano largo y estrecho en la parte craneal que sirve para la cópula, se encuentra situado entre el cérvix y el vestíbulo, su porción más anterior es un fondo de saco que se extiende hacia adelante en dirección del cuello^{20,25}.

El vestíbulo vaginal es la porción que conecta la vaginal y la entrada de la uretra con la abertura genital externa. Las glándulas vestibulares menores abren

ventralmente sus conductos a los lados de la cresta media a diferencia de las mayores que no están presentes en la perra ²⁰.

Los órganos externos son el clítoris y la vulva. El clítoris es ancho y plano, localizado en el piso del vestíbulo y en promedio mide 3 a 4 cm; no tiene estructuras eréctiles a diferencia del glande que se sitúa en la fosa del clítoris y la vulva es un órgano con dos labios que forman una comisura ventral puntiaguda y una dorsal ^{20, 25}.

3.2. ENDOCRINOLOGÍA DEL CICLO REPRODUCTIVO

Anestro

Es la etapa reproductiva destinada a la reparación uterina para el inicio de un nuevo ciclo, en la cual no hay signos externos de actividad ovárica; se inicia con el parto y precede al proestro. Es un estado de inactividad, pero no de quietud hormonal, debido a que se detectan fluctuaciones de hormonas provenientes de los ovarios y la hipófisis ^{13, 21}. La duración es variable (2 a 10 meses), en promedio 4 meses y depende de muchos factores como raza, salud, edad, época del año, ambiente, estado ovárico y uterino entre otros ^{13, 26, 27, 28}.

Durante el anestro, las concentraciones de LH son variables y los valores promedio son significativamente elevados en comparación a los reducidos niveles observados durante el curso del proestro y principios del estro ^{28, 29}. Los pulsos de LH son de 2 a 25 ng/ml (en promedio 8 ng/ml) aproximadamente cada 3 a 7 h y entre cada pulso las concentraciones son de 0.2 a 1.2 ng/ml ^{13, 28}. En más del 75% de las perras la frecuencia de los pulsos de LH se incrementa al final del anestro (25 a 10 d antes del pico de LH) a más de 2 pulsos en 7 h ^{27, 30}. Los intervalos entre cada pulso, 1 a 2 semanas previas al proestro, se reducen a un periodo de 60 a 120 min ²⁶.

La FSH no parece tener variaciones amplias de concentración, los niveles se encuentran elevados, detectándose hasta 300 ng/ml y al iniciar el proestro declinan ²⁷.

Las concentraciones de estrógenos fluctúan de manera significativa durante el anestro. Se han observado elevaciones de secreción de estrógenos y suponen que se debe a ondas de desarrollo folicular de naturaleza subclínica (sin cambios en el comportamiento ni en el epitelio vaginal) y tal vez de corta duración. Estos folículos sintetizan y secretan estrógenos, lo que produce ligeros incrementos en la concentración circulante (5 a 30 pg/ml) debido a que los folículos no maduran por completo e involucionan antes de ser capaces de sintetizar progesterona ^{13, 26}. El estradiol comienza a incrementarse al final del anestro aproximadamente 30 d antes del pico preovulatorio de LH y se ha sugerido que el fin de la etapa de anestro se

debe a las oleadas de desarrollo folicular que generalmente terminan en atresia pero provocan considerables elevaciones de estradiol ^{13, 27, 30}.

Los niveles de prolactina se encuentran bajos durante el anestro (1 a 2 ng/ml) ^{13, 26}, y tienden a incrementarse en la transición del anestro a los primeros días del proestro (4.8 ng/ml). Se ha observado en algunas especies que la prolactina puede estar implicada en la disminución de la respuesta ovárica a las gonadotropinas y en perras se ha visto que la inhibición de la secreción de prolactina puede acortar el anestro ³⁰.

Los niveles de progesterona en este periodo se mantienen basales, en no más de 0.5 ng/ml ³¹.

En relación a la LH se han observado dos elevaciones esporádicas, una inmediatamente al inicio del proestro y la otra precede o coincide con el inicio del estro y la ovulación subsiguiente ¹⁴.

Proestro

Los mecanismos que controlan la progresión de anestro a proestro no han sido aclarados totalmente. El proestro es considerado el inicio del ciclo reproductivo y el periodo de la fase folicular o de dominancia estrogénica que se extiende desde el primer día de sangrado vaginal hasta el inicio del estro y puede tener una duración de 3 a 21 d y en promedio 9 d ²⁸. En esta etapa pueden observarse diferentes signos que consisten en secreción sanguinolenta transvaginal por diapédesis de eritrocitos procedente del endometrio, agrandamiento de la vulva, atracción del macho por la secreción de feromonas; cambios en la mucosa y en la citología vaginal. Algunas perras muestran secreción sanguinolenta durante todo el proestro, estro y hasta el diestro; en tanto que otras sólo la presentan al principio del proestro ^{13, 21, 23, 26}.

La perra en proestro se encuentra bajo la influencia de estrógenos. Los folículos ováricos en desarrollo, que coinciden con la estimulación de gonadotropinas, son capaces de producir y secretar estrógenos. Por lo general las concentraciones circulantes de estrógenos al inicio del proestro son por arriba de 25 pg/ml y casi al final pueden ser mayores de 60 a 70 pg/ml. La concentración máxima de estradiol (100 a 110 pg/ml) se alcanza 24 a 48 h antes de terminar el proestro y disminuyen durante la oleada de LH y el estro ^{13, 26, 28}.

Las concentraciones de progesterona plasmática se incrementan durante el proestro de valores basales (0.4 a 0.6 ng/ml) a valores de 0.8 a 1.2 ng/ml en las últimas 24 a 72 h, probablemente como resultado de pulsos esporádicos de LH que influyen en los folículos, provocando cierto grado de maduración y luteinización antes del estro ^{28, 31, 32}. Los valores se incrementan rápidamente por arriba de 1

ng/ml durante o después de un corto tiempo de que se presenta la oleada preovulatoria de LH, lo que indica que la luteinización se inicia antes o junto con la ovulación en el caso de la perra^{13, 14, 33, 34}. En el proestro, la LH tiene niveles muy bajos, posiblemente por retroalimentación negativa de los estrógenos²⁷. Los pulsos casi no se detectan, sin embargo 1 a 2 d antes del pico preovulatorio se incrementan entre 2 a 25 ng/ml durante los episodios pulsátiles^{13, 26, 28} y durante el pico preovulatorio llegan a ser de 13.6 a 42.4 ng/ml^{27, 35}, estimulando la producción de progesterona en los folículos cada vez más luteinizados¹⁴. El aumento repentino de LH previo a la ovulación coincide con la concentración de progesterona de 1ng/ml y se relaciona con el inicio del estro, aunque puede presentarse durante la etapa final del proestro o incluso en algunas perras al inicio del estro pero por lo general coincide con la transición entre las dos fases en la mayoría de las perras^{13, 14}.

La FSH disminuye a 100 ng/ml durante el proestro y se incrementa nuevamente durante el pico preovulatorio de LH ó 1 a 2 d después del mismo para declinar sus niveles durante el resto del estro aun más abajo que los de la LH posiblemente por su tiempo de vida media^{26, 27}.

Estro

Se define como el periodo de receptividad sexual provocada por una concentración sérica decreciente de estrógenos y creciente de progesterona^{13, 21, 26}. Se caracteriza por una respuesta positiva al comportamiento sexual. Quedarse quieta, presentar la vulva, lordosis, flexión y desviación de la cola hacia un lado, permitir la monta y penetración del miembro peneano son algunos de los signos observados²⁸. El inicio, se presenta 1 a 2 d después del pico preovulatorio, sin embargo puede no estar tan sincronizado con el periodo fértil y puede ser tan temprano como 4 d antes o 6 d después del pico de LH. La duración de este periodo comprende normalmente un intervalo de 3 a 21 d^{26, 28}.

En esta etapa los niveles séricos de estrógenos comienzan a decrecer como reflejo de la maduración del folículo. La combinación de una decreciente concentración de estrógenos y creciente de progesterona estimula un evento hormonal de retroalimentación positiva al hipotálamo e hipófisis que estimula la síntesis y producción de FSH y LH al inicio del estro y el comportamiento de estro en la mayoría de las perras^{13, 26}.

Los niveles de progesterona sérica durante el pico preovulatorio en el día cero son generalmente de 1 ng/ml²⁶, un día después del pico de LH los niveles varían de 0.99 a 2.26 ng/ml, dos d después 2.12 a 4.06 ng/ml, en el día 3 se incrementan de 3.29 a 6.01ng/ml y al cuarto día 5.23 a 11.78 ng/ml³⁵. Las concentraciones de progesterona son aproximadamente de 4 a 8 ng/ml en el momento de la ovulación³², la cual ocurre en la mayoría en un periodo de 36 - 50 h en d diferidos durante la

primera mitad del estro, pero puede presentarse hasta 72 h después del pico de LH ³⁶. Las concentraciones de estradiol declinan constantemente durante el estro hasta 15 pg/ml, estos niveles se reflejan en la citología vaginal y atracción a los machos ³². En cuanto a la prolactina las concentraciones pueden ser de 32 ng/ml ^{37, 32}.

Diestro

Es el periodo que le sigue al estro, se relaciona con la actividad de los cuerpos lúteos. En la perra durante esta etapa los folículos luteinizados y cuerpos amarillos continúan produciendo progesterona en cantidades crecientes. Al igual que el estro esta es una fase dominada por la progesterona. Las concentraciones de progesterona en todas las perras muestran incrementos marcados ³⁸, con rangos absolutos de concentración que se traslapan y no permiten diferenciar a las perras preñadas de las que no están ^{14, 26, 28}.

Los cuerpos lúteos, suelen alcanzar el punto máximo en producción de progesterona 20 a 30 d después de la ovulación (15 a 80 ng/ml) ^{14, 21, 39}, esos niveles persiste por una a dos semanas adicionales. La lisis del cuerpo lúteo de perras no preñadas puede ocurrir entre los 60 a 100 d ¹⁶. Esta etapa termina cuando las concentraciones séricas de progesterona retornan a niveles basales ^{13,14, 26}.

La LH es luteotrópica y las concentraciones basales son necesarias para la secreción de progesterona durante la fase lútea del ciclo. De la información actual se deduce que la prolactina y la LH son necesarias en la perra para el mantenimiento del tejido lúteo en periodos específicos. La función lútea temprana en la perra se considera autónoma y es dependiente del soporte luteotrópico pituitario durante la segunda mitad ¹⁴.

Las concentraciones séricas de estradiol en el diestro son basales (5 a 23 pg/ml) ²⁶.

La prolactina es siempre detectable, es un requerimiento luteotrópico posterior al día 30 ó 35 y no es específica de la preñez ⁴⁰.

3.3. *Diestro en perras gestantes*

Actualmente han encontrado evidencias que indican incrementos específicos de la función lútea en perras preñadas, incluyendo secreciones adicionales significativas de progesterona y estrógenos. Un estudio demostró incrementos significativamente altos de progesterona sérica en la mitad de la gestación después de los 20 a 25 d, y en otro en otro estudio secreciones significativamente altas de estrona en la segunda mitad de la gestación. En algunos estudios la secreción de progesterona

y estrógenos fueron marginalmente más altos en perras preñadas después del día 30. Sin embargo, la diferencia entre el día 35 y el 60, se considera significativa si se hace la correlación con la hemodilución de la preñez como reflejo de la disminución del hematocrito aproximadamente en el día 30 y al final hasta 1 a 2 meses después del parto. De la misma manera el contenido fecal de estradiol y progesterona son significativamente más altos en la preñez que en perras no preñadas entre el día 30 y 60 de la gestación). Estos hallazgos presumiblemente reflejan la producción y disponibilidad del estradiol y progesterona durante la preñez, tanto como los incrementos en la remoción y excreción hepática ¹³.

Durante el último tercio de gestación las concentraciones de progesterona declinan lentamente a una meseta de 4 a 16 ng/ml, la cual se mantiene por 1 a 2 semanas ^{13,28}, casi al finalizar la gestación; 5 d antes del parto descienden a 4.5 ± 0.6 ng/ml, a las 36, 18 y 9 h previas al parto los valores de progesterona son de 3.2 ± 0.4 , 1.2 ± 0.4 y 0.6 ± 0.1 ng/ml respectivamente y después del parto por arriba de 0.5 ng/ml ²⁸. La caída de progesterona, aproximadamente a los 65 d después de la fecundación, se debe a la lisis del cuerpo lúteo. Las concentraciones séricas de progesterona retornan a niveles basales ^{13, 14, 26}.

En perras tratadas con prostaglandinas f2 alfa en las que se produce una luteólisis incompleta, se ha observado que mantienen la preñez por varios días a pesar de los niveles bajos de progesterona (2 ng / ml) ²⁸.

Los resultados de un estudio demostraron que la implantación puede ocurrir normalmente y la preñez puede ser mantenida a término cuando se provee progesterona natural sola como terapia de reemplazo en perras ovariectomizadas antes de la implantación. La ovariectomía se realizó a los 14 d y el aporte de progesterona fue sustituido con implantes.

Las concentraciones de cortisol materno fluctúan dentro de los rangos normales durante la última semana de gestación (15 a 25 ng/ml), un día antes del parto se elevan a 40 a 80 ng/ml y vuelven a disminuir durante el parto (10 a 25 ng/ml). Por lo tanto se puede considerar que el parto en la perra está desencadenado por la maduración del eje pituitario adrenal como sucede en otras especies ²⁸.

El incremento en la concentración sérica de prolactina en perras a mitad de la gestación es presumiblemente de origen pituitario. No se sabe si el útero de la perra, como en roedores y primates tiene la capacidad para producir prolactina o una hormona parecida a la prolactina que pueda cruzar en radioinmunoensayo con la prolactina ⁴⁰. La progesterona es el único esteroide ovárico que se requiere para la implantación y placentación en perros. El uso de la progesterona natural para tales estudios excluye la presencia de algún efecto estrogénico que pueda estar ejercido por la síntesis de progestágenos en la perra, pero no se sabe si el cigoto durante la pre-implantación es capaz de convertir a la progesterona o andrógenos

a estrógenos en perros y es posible que este sea un papel para que localmente se produzcan estrógenos en la implantación ⁴⁰.

Los incrementos de las concentraciones séricas de relaxina no son detectados en la gestación temprana, únicamente hasta los días 26 a 30, y usualmente no se detectan antes que los niveles de prolactina, sin embargo la primera es considerada específica de la preñez, mientras que la prolactina es detectable siempre, no es específica de la preñez y es un requerimiento luteotrópico posterior al día 30 ó 35 ⁴⁰.

La relaxina es la única hormona que puede utilizarse como método químico para diagnosticar la preñez. Los falsos negativos usando la relaxina comercial han sido reportados como anécdota, si es real quizá se relacione con camadas muy pequeñas o preñez de un solo cachorro ⁴⁰.

Las concentraciones de prolactina continúan en incremento durante la gestación y hay un abrupto incremento adicional en el momento del parto, posiblemente desencadenado por la disminución en las concentraciones de progesterona antes del parto ⁴⁰. Las concentraciones de prolactina pueden reducirse 1 a 2 d después del parto ⁴¹, pero se incrementan durante la lactación, con frecuencia a concentraciones más altas que las observadas durante la preñez. El amamantamiento estimula la liberación de prolactina durante la lactación y es lógico que disminuya durante el periodo de destete ⁴⁰.

3.4. FOLICULOGÉNESIS

La maduración del ovocito no está limitada a la fase folicular, ocurre en varias etapas, se inicia durante el desarrollo embrionario de la hembra y continua hasta su etapa reproductiva ^{42, 43}. Durante el desarrollo embrionario las células germinales primordiales (gonocitos) invaden a la gónada femenina para diferenciarse en ovogonias y proliferan al dividirse por mitosis dentro del parénquima del ovario ⁴⁴. En la perra la producción de ovocitos a partir de las células germinales primordiales ocurre aún después de nacer y posiblemente persiste por más de dos meses porque la proliferación de células parecidas a las germinales ha sido observadas en pequeños grupos distribuidos en toda la corteza ovárica en perras mayores de 2 meses de edad ⁴². Los folículos primordiales se observan en perras con 3 semanas de nacimiento, estos folículos contienen ovocitos primarios que inician la primera división meiótica, llamada reduccional porque implica la disminución a la mitad en el número de cromosomas característico de la especie (78 a 39 en la perra). Esa célula haploide permite el intercambio de información genética entre cromosomas. Un miembro de cada par cromosómico se deriva de la hembra y el otro del macho. Cabe hacer mención que el ovocito detiene su proceso de maduración en Metafase II ²¹.

Bajo influencia de factores intrínsecos ováricos algunos folículos primordiales crecen y se desarrollan. La duración del desarrollo folicular total en la perra es aproximadamente de 110 d y el 85% de este tiempo está dedicado al crecimiento del ovocito, proliferación de las células de la granulosa, formación de zona pelúcida, teca interna y teca externa mientras está en la etapa de folículo preantral^{22, 23}. En contraste, el folículo antral tiene un crecimiento muy rápido, en él se desarrolla la vascularización, se incrementa la respuesta a FSH y la adquisición de receptores a LH, se expande el antro como consecuencia de la secreción de las células foliculares y factores de crecimiento (factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento epidermal y factor de crecimiento I) también alcanza una gran actividad esteroideogénica conduciendo a la máxima secreción de estradiol cuando se considera folículo preovulatorio. La mayoría de los folículos degeneran en atresia antes de llegar al estado preovulatorio²².

Durante la maduración del folículo y la ovulación, hay cambios morfológicos y bioquímicos de la teca interna y células de la granulosa; estos cambios morfológicos del folículo preovulatorio están clasificados en tres estados de desarrollo, todos con diferente grado de luteinización. El estado inicial (I) se encuentra en ovarios con folículos cubiertos por una capa delgada de células de la granulosa, pero ligeramente aplanada, los ovocitos están pegados a la pared folicular por la compactación del *cumulus oophorus*, se estima que la ovulación será después de transcurrir 2 ó 3 d¹⁴. En el estado II o estado intermedio se observa la capa de células de la granulosa, no existe área de adelgazamiento sobre la superficie del ovario, los ovocitos sin estar completamente libres están rodeados por células del *cumulus* organizadas, estos folículos sobresalen aproximadamente 1 mm de la superficie del ovario y la bursa ovárica contiene una pequeña cantidad de fluido transparente; la ovulación estimada en este estado es en un período de 1 a 2 d. El estado más maduro o estadio III, se caracteriza por tener una área focal de adelgazamiento en la superficie ovárica, las células de la granulosa están totalmente luteinizadas y los ovocitos libremente flotando dentro del folículo rodeado por células dispersas del *cumulus oophorus*¹⁴, 12 h antes de la ovulación los folículos sobresalen aproximadamente 2 mm de la superficie ovárica. El folículo antral mide 4 a 6 mm de diámetro y la bursa ovárica contiene aproximadamente 2 a 3 mm de fluido transparente, la ovulación se considera inminente^{8, 14, 22}. Durante el periodo de ovulación, una pequeña cantidad de hemorragia se observa en el lugar de la ovulación y la bursa ovárica queda llena de fluido rosa o rojo; 12 h después de la ovulación el punto ovulatorio y el área adyacente están de color rojo, hay poca hemorragia y el líquido contenido en la bursa ovárica es transparente⁸.

La perra durante la primera mitad de la fase de estro, 36 a 48 h después del pico de LH, ovula ovocitos primarios con vesícula germinal; después los ovocitos primarios sufre la primera división meiótica y completan la metafase para convertirse en un ovocito secundario, aproximadamente 48 h después de la

ovulación y adquiere la capacidad de ser fertilizado durante el descenso hacia el segmento distal del oviducto ^{8, 24, 28, 32, 45, 46}; hasta aproximadamente 2 a 5 d posteriores a la ovulación, una vez que maduran (completan la metafase) y se convierten en ovocitos secundarios ^{8, 28, 35, 32, 47}. El ovario en la perra libera ovocitos primarios por un periodo de 2 a 3 d y su vida fértil una vez que maduraron termina en 2 o 3 d más ^{28, 4}.

El periodo de monta con posible concepción en la perra abarca desde el inicio del estro hasta 108 h después de la ovulación ^{8, 35, 45}.

3.5. OVULACIÓN Y PERIODO FÉRTIL

En la mayoría de los ciclos preovulatorios el pico de LH ocurre dentro de las 24 h previas a la transición del proestro hacia el estro, sin embargo en algunos ciclos el inicio del estro y la primera monta puede ocurrir tan temprano como 2 a 3 d antes del pico de LH, mientras que en muchas otras pueden ocurrir hasta los 4 ó 5 d después del pico de LH. En el extremo una perra en el final del proestro puede ser montada por un macho agresivo tan temprano como 4 a 5 d antes del pico de LH, mientras que algunas perras pueden rehusarse a la monta por 6 a 7 d después del pico de LH, sin embargo la ovulación en la perra ocurre durante el principio del estro, entre las 48 y 60 h y a veces 72 h después de haber iniciado el estro ^{8, 28}.

Como se mencionó anteriormente la mayoría de las veces el pico de LH produce una rápida maduración de los folículos, luteinización temprana y ovulación en los siguientes 2 a 3 d ²⁸. El proceso de transformación de folículos secretores de estrógenos (3 a 4 mm) a cuerpos lúteos (8 a 9 mm) secretores de progesterona ²⁸, permite hacer un seguimiento en base a los niveles hormonales ⁴². La detección del pico de LH permite pronosticar el periodo fértil, considerado como el periodo en el cual la monta o la inseminación artificial producirá un establecimiento exitoso de la gestación; sin embargo, debido a que los cambios en la concentración plasmática de progesterona siguen un patrón más consistente y tienen una relación temporal con el pico de LH, medir niveles de progesterona puede ser más práctico. La progesterona plasmática gradualmente se incrementa de niveles basales durante el anestro a valores de 1 a 2 ng/ml en el momento del pico de LH ⁴⁸ y hasta 4 ng/ml ^{5, 24} después de la ovulación; para la maduración del óvulo se espera un periodo variable de dos días ³⁵ y hasta 5 d ^{8, 32}. Los límites del periodo de fertilización son comúnmente de 4 a 9 d después del pico de LH y la concentración de progesterona será de 6 a 10 ng/ml en el periodo de fertilización. La progesterona se incrementa bruscamente (30 a 90 ng/ml) 10 a 20 d después del pico de LH ¹³. Se debe considerar que las concentraciones plasmáticas de progesterona se incrementan rápidamente y después de que se inicia la luteinización folicular la inseminación no debe demorar si se observan niveles mayores a 3 ng/ml ⁴⁸. Por lo tanto las montas dos días antes del pico de LH rara vez son fértiles, las que se realizan al final del estro 7 a 8 d después del pico de LH

pueden ser fértiles, pero las montas aplazadas 9 a 10 d después del pico de LH rara vez son fértiles o llegan a producir camadas de 1 a 2 cachorros ²⁸. La viabilidad de los espermatozoides 2 a 6 d en el aparato reproductor de la hembra o la reducida viabilidad de los ovocitos maduros después de 1 a 2 d en el oviducto son factores que influyen en el éxito de las montas ⁴⁰.

El pico de fertilidad por monta natural está entre los días 0 y 5 después del pico de LH y el momento fértil para inseminación con semen congelado es entre los días 4 y 5 después del pico de LH, porque la longevidad del espermatozoide es usualmente corta después de la descongelación ²⁸.

La gestación pueden resultar de montas tan tarde como el día 10 después de la ovulación ²⁶.

3.6. DIAGNÓSTICO DEL CICLO ESTRAL

3.6.A. Citología vaginal

La vagina está forrada en su luz por capas de células epiteliales escamosas que responden engrosándose al incremento de estrógenos. En forma normal durante el anestro el epitelio está cubierto por pocas capas de células y es susceptible a daños, cuando está bajo la influencia de los estrógenos engruesa por la presencia de 20 a 40 capas celulares ^{13, 47, 49}. Este engrosamiento protege a la vagina durante la cópula ⁴⁸, por lo tanto cuando las células epiteliales cornificadas predominan, la perra está en proestro o estro ^{13, 49, 47}.

Las alteraciones que se presentan en la mucosa y lumen vaginal, como resultado de una mayor concentración sérica de estrógenos durante el proestro y el estro, se refleja en el aspecto de las células epiteliales vaginales exfoliadas. Las perras bajo la influencia de folículos funcionales y en proceso de maduración están bajo el efecto de concentraciones cada vez más altas de estrógenos, éstos causan engrosamiento de la mucosa vaginal y provocan que las células de la luz vaginal estén cada vez más alejadas de su aporte sanguíneo ^{1, 16}. Por este motivo la citología vaginal puede servir como una valoración primaria indirecta confiable de la presencia de estrógenos ¹³.

La nomenclatura de las células epiteliales vaginales se basa en su morfología. Los diferentes tipos de células representan etapas del ciclo de vida celular. A medida que mueren las células vaginales redondas y saludables, se vuelven más grandes y de forma más irregular. Los núcleos dentro de las células epiteliales sufren cambios que reflejan muerte celular, el núcleo se torna cada vez más pequeño y después picnótico, antes de desintegrarse, dejando un " fantasma" nuclear y luego una célula anucleada. El nombre que se les asignó a este tipo de células son básicamente tres: parabasales, intermedias y superficiales; sin embargo debido a

que están en constante desarrollo, algunas de las células que se observan no están dentro de estas tres rígidas categorías ¹³.

Además de células epiteliales vaginales se pueden distinguir otras células como leucocitos, eritrocitos y en algunas ocasiones bacterias ¹³.

Clasificación de las células vaginales

Las células parabasales son las células epiteliales más pequeñas que se observan en un frotis vaginal, éstas son redondas o casi redondas y tienen un gran núcleo en comparación con su citoplasma. Las células parabasales están prevaleciendo en los frotis tomados durante el diestro y anestro, estas células están notablemente ausentes durante el estro ^{23, 36, 50}.

Las células intermedias varían en tamaño y forma, pero típicamente tienen un diámetro dos a tres veces mayor que el de las células parabasales. Algunos clasifican estas células en: intermedias pequeñas casi redondas o de forma oval con un núcleo prominente e intermedias grandes de forma poligonal con un núcleo pequeño en comparación con el citoplasma. Estas células están prevaleciendo durante todos los estados del ciclo excepto el estro ^{8, 36, 50}.

Las células superficiales, de forma poligonal, núcleo picnótico, casi ausente o ausente y parecidas a las hojuelas de maíz, son las células más grandes en el frotis vaginal. Normalmente no son vistas durante el anestro y se incrementan durante el proestro. La presencia de un gran número de células superficiales indican un estado de estro y su abrupta y precipitada disminución marca el inicio del diestro ^{8, 36, 50}.

Las otras células observadas en un frotis vaginal incluye a los eritrocitos, usualmente observados en gran número durante el proestro. En algunas perras, son vistos alrededor del estro e incluso en el diestro temprano. Los neutrófilos a menudo abundan durante el diestro temprano y no necesariamente son indicativos de una vaginitis ¹³. Los leucocitos pueden salir de los vasos sanguíneos por diapédesis y observarse hasta un día antes del estro o al finalizar la etapa de estro indicando el fin del periodo fértil ³⁶.

Las "células espumosas" es un término que se le da a las células epiteliales que contienen numerosas vacuolas que son típicamente vistas durante el diestro ⁸.

Cambios citológicos durante el ciclo estral en la perra

Los estados del ciclo estral canino puedan ser definidos hasta cierto grado por el comportamiento sexual, signos físicos (edema vulvar, secreción vaginal) o por citología vaginal. El período de receptividad varía considerablemente entre las

perras; en algunas perras ocurre antes o después del periodo de fertilidad potencial ^{47, 48}.

Los cambios citológicos durante el ciclo estral canino reflejan los cambios en la concentración de estrógenos en la sangre. El incremento de los niveles de estrógenos induce la "cornificación" característica de los frotis examinados durante el estro 2 a 3 d después del pico de 17-estradiol en las concentraciones plasmáticas ^{48, 36}. La máxima queratinización está cercanamente asociada al pico de LH, 3 a 6 d después del pico de estradiol ³⁶.

Anestro: Las células intermedias y parabasales predominan en el frotis vaginal. Durante el anestro, las células superficiales están ausentes o se encuentran en escasa cantidad. Los neutrófilos pueden estar presentes o ausentes, por lo general los eritrocitos están ausentes y puede haber bacterias que representan a la flora normal. El aspecto del fondo puede ser claro o granuloso ¹³.

Proestro: El frotis vaginal desde el principio hasta el final del proestro tiene un cambio gradual de células intermedias y parabasales a las típicas células superficiales, presencia de neutrófilos, bacterias y glóbulos rojos en gran número,

Estro: Los cambios celulares progresivos del frotis vaginal constituyen el principal signo durante el proestro y el estro. El máximo de queratinización en las células epiteliales vaginales ocurre en un periodo de 3 a 6 d después del pico de estradiol ⁴⁸.

Las característica que definen el estro con relación a la citología es la predominancia de células superficiales. La mayoría de las perras estará bajo una total cronificación. En el frotis hay un monótono patrón compuesto casi exclusivamente de células superficiales anucleadas o con pequeños núcleos picnóticos. Algunas perras presentan el máximo desarrollo como células superficiales con pequeños núcleos y nunca alcanzan el estado de células exclusivamente anucleadas. Por este motivo ambos tipos celulares son considerados un mismo grupo ⁴⁷.

El engrosamiento del epitelio vaginal bloquea la migración de neutrófilos al lumen de la vagina y en la citología rara vez se observaran durante el estro ^{47, 49}.

Diestro: el inicio del diestro está marcado por una precipitada disminución en el número de células superficiales y reaparición de células parabasales e intermedias, los cambios proliferativos celulares se presentan más comúnmente en un solo día, de esencialmente 100% de células superficiales a menos del 20%

La importancia de identificar el inicio del diestro es que este es considerado el indicador más certero del inicio de la gestación, y con base en el se pueden

predecir los días de gestación. Las perras paren normalmente 56 ó 57 d después del inicio del diestro citológico y por lo tanto el tiempo de gestación es usualmente 57 ± 1 día del inicio del diestro (día 1). El periodo de comportamiento de estro es variable, y a menudo se extiende por varios días antes o después del estro citológico por lo tanto el tiempo de gestación calculado a partir del inicio o cese de receptividad está correspondiendo de manera inexacta ^{47, 49}.

El inicio del diestro además esta bien relacionado con el fin del periodo de fertilización y las cruza después del diestro raramente son fértiles ⁴⁸.

3.7. DESARROLLO EMBRIONARIO

3.7.A. Desarrollo embrionario temprano (cigoto a mórula)

Los eventos de la gestación canina parece que ocurren consistentemente en relación al tiempo del pico preovulatorio (pico de LH = día 0) ^{40, 46}, dos días después se observa la ovulación y a los 5 d el óvulo alcanza un estado fertilizable ⁴⁰; Van der Stricht en 1923 observó *in vivo* por primera vez la penetración del espermatozoide al ovocito en varios estados de maduración, sin embargo notó que no existieron cambios en la cabeza del espermatozoide hasta después de la extrusión del segundo cuerpo polar y Tsutsui en 1975 descubrió que el cuerpo polar del óvulo es eliminado 3 d después de la ovulación y una vez fertilizado, el cigoto desciende a la parte media del oviducto ^{21, 45}.

El intervalo desde la fertilización al estado de 64 células del embrión ha sido motivo de estudio para diversos investigadores interesados en la transferencia de embriones; los resultados han sido variables, al parecer la división de los embriones entre los estados de 2 y 16 células ocurre más rápidamente después de la fertilización de ovocitos maduros. Fueron observados embriones de 16 células en el día 11 después del pico de LH después de una inseminación temprana o tardía ⁴⁰. Se observaron estados equivalentes de desarrollo embrionario en ambos oviductos al haber inseminados antes y después de la maduración de los óvulos; el intervalo del estado de cigoto al de 8 células tiene un rango de 2 a 3 d cuando la unión de los gametos ocurre después de la maduración del ovocito y de 7 a 10 d cuando esta ocurre antes de la maduración del ovocito, esto explica en parte porqué la duración de la gestación es similar si la monta ocurre antes o varios días después de la maduración de los ovocitos; pueden estar involucradas una división más acelerada previa a la implantación, un aplazamiento en la implantación o un periodo acelerado de desarrollo posterior a la implantación ⁴⁰.

La primera división del cigoto se observa entre las 72 y las 120 h después de la ovulación, a las 144 h ya se pueden observar 8 células y a las 192 h embriones de 16 células; en este periodo los embriones se encuentran el oviducto ^{27, 45}.

Entre las 204 y 216 h después de la ovulación los embriones tienen más de 16 células y se acumulan cerca de la unión útero tubárica de los oviductos para transformarse en embriones de 32 a 64 células antes de emigrar al útero. Los embriones de perra descienden del oviducto a los cuernos del útero como mórulas compactas o blástulas ^{7, 24}, este desarrollo embrionario se alcanza en los primeros 8 a 12 d después del pico preovulatorio ó 6 a 10 d de iniciada la ovulación ^{13, 24}.

Tsutsui, *et al.* (2001), informaron los estados de desarrollo embrionario el día 8 después de la ovulación (4 a 6 d después de la monta), consistieron básicamente de embriones con 8 - 16 células y en una perra obtuvieron embriones de más de 16 células, los embriones recolectados 9 a 10 d de la ovulación fueron de 16 células y blástulas ², sin embargo los embriones recolectados el día 11 en 2 perras fueron únicamente mórulas compactas ².

En general el desarrollo de los embriones caninos es aproximadamente de un ciclo celular cada 24 h en las primeras 6 divisiones ⁴⁶. Las diferencias encontradas al respecto por diferentes autores pueden estar influenciadas por el momento de fertilización indicando una división embrionaria más rápida entre el estado de 2 a 16 células después de la fertilización de ovocitos maduros y lo contrario en la fertilización de ovocitos menos maduros ⁴⁰.

3.7.B. Desarrollo embrionario antes de la implantación

La migración intrauterina transcornual ocurre del día 12 hasta el 17 ^{28, 40}. Los estudios de recolección y ultrasonografía parecen indicar que la migración embrionaria cesa y finalmente los embriones se localizan en el lumen uterino entre el día 16 y el 18 ¹³. Antes de la implantación pueden observarse por ultrasonografía las vesículas embrionarias como esferas no ecogénicas con 1 mm de diámetro aproximadamente los días 17 a 19. La vesícula aumenta a 2 mm de diámetro y alcanza un tamaño de 3 a 6 mm entre los días 20 y 22. Puede llevarse a cabo la recolección de embriones intactos tan tarde como el día 18 ó 19, pero la expansión de los embriones dentro de las vesículas embrionarias oblongas en el útero evita la recolección de algunas blástulas intactas después del día 20 ó 21. Algunas blástulas aumentan de tamaño y permanecen dentro de la zona pelúcida entre los días 14 y 18, pudiendo quedar rodeados por ella tan tarde como el día 19 y la pierden cuando se expanden una vez más entre los días 19 y 20 ⁴⁰.

En el día 12 se recolectaron exclusivamente blástulas en estadios tempranos y avanzados, en estos últimos es notorio el adelgazamiento de la zona pelúcida y el incremento de tamaño ²⁴.

Doce días después del pico preovulatorio y por un periodo de 3 d, las blástulas de 0.3 a 1.0 mm flotan en los cuernos uterinos, a los 18 d es más notoria la diferencia de tamaño entre la blástula temprana y la blástula expandida, que migra libremente

como una estructura de 2 mm por todo el útero ^{13, 24}.

De acuerdo a Stabenfeldt las blástulas fueron halladas a partir del día 6 a 20 después del coito en el útero de la perra ¹⁷.

3.7.B. Implantación

Las blástulas pueden permanecer sin implantarse tan tarde como los días 21 y 22, pero algunos quedan adosados al endometrio por la invasión del trofoectodermo de la placenta en el endometrio desde el día 19 ⁴⁰. En ocasiones la implantación ocurre solo 1 a 3 d antes de que el latido cardiaco pueda ser detectado por ultrasonografía entre 24 y 25 d después del pico de LH ^{28, 40, 48}.

El parto ocurre 64 a 66 d después del pico de LH, si la monta o inseminación tiene lugar 3 a 5 d antes de dicho pico (con aparente duración de la gestación de 66 a 70 d), ó 3 a 5 d después de la ovulación con una duración de la gestación de 57 a 61 d ⁴⁰. (Ver cuadro 1)

3.8. DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN

El diagnóstico de gestación utilizando el método de palpación puede realizarse a partir del día 20 ó 25 después de la monta. El ultrasonido para detectar las vesículas embrionarias o el latido del corazón de los embriones, permite diagnosticar la preñez en una etapa temprana un par de días después de la implantación ^{28, 40, 48}.

No hay ensayos disponibles para el diagnóstico de la preñez en perras basado en gonadotropina placentaria porque no se ha detectado, como en el caso de la yegua y la mujer, sin embargo, la relaxina se mide en el plasma por radio-inmunoensayo después de la tercera semana de gestación y es posible usarla como una prueba de gestación en la hembra canina ²⁸.

3.9. MÉTODOS DE INDUCCIÓN AL ESTRO

Actualmente se desconoce el factor que regula la duración del anestro, este concepto adquiere importancia clínica cuando se intenta mejorar la fecundidad mediante la inducción del estro con hormonas, debido a la dificultad que se tiene para simular la delicada coordinación de eventos que llevan a un nuevo ciclo ovárico y ovulación en la perra ¹³.

El anestro termina naturalmente cuando hay incremento en la frecuencia y amplitud de liberación de la GnRH, que a su vez estimula la secreción de pulsos significativamente elevados de LH poco tiempo antes de iniciar el proestro ^{13, 28}. Se desconocen los mecanismos que están involucrados en la modificación de la

secreción de los patrones de LH, aunque para inducir artificialmente el estro durante el anestro los investigadores han utilizado diversos productos hormonales entre los que podemos citar de acuerdo a su clasificación:

1.- Fármacos hormonales esteroidales como los estrógenos (dietil estilbestrol y benzoato de estradiol). Se ha demostrado que la estimulación excesiva con este tipo de hormonas produce efectos adversos como: endometritis, hiperplasia quística endometrial, piometra e infertilidad, supresión de la médula ósea, trombocitopenia, anemia aplásica y muerte ⁶.

2.- Fármacos hormonales no esteroidales:

a) hormonas liberadoras (hormona liberadora de gonadotropinas GnRH y agonistas de la GnRH ⁵.

b) hormonas adenohipofisarias (hormona luteinizante y hormona folículo estimulante). No se tienen datos suficientes de sus reacciones secundarias pero se considera que tienen un mecanismo de acción más apegado al que desencadena el inicio del ciclo reproductivo.

c) hormonas placentarias (gonadotropina coriónica humana y gonadotropina coriónica equina) ³¹. El tratamiento prolongado con la combinación de estas dos hormonas puede provocar la presentación de hiperestrogenismo que en ocasiones conduce a anemia no regenerativa y trombocitopenia ⁶.

A pesar de que los fármacos antes mencionados han sido utilizados para inducir estro con ovulación, los resultados no han sido constantes aún con protocolos similares y hasta el momento no ha sido posible inducir con éxito la sincronización y superovulación en la perra ^{5,6}.

3.9.A. Uso de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) o uno de sus agonistas

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), es un decapeptido que mantiene la misma estructura en todos los mamíferos. Todas las moléculas de GnRH son activas en otros vertebrados aunque con diferentes patrones de respuesta. Los mamíferos responden preferentemente a la GnRH de mamíferos. En la mayoría de ellos esta hormona es liberada en pulsos cada una a dos horas durante la foliculogénesis, producida en los núcleos hipotalámicos y liberada sobre la eminencia media del hipotálamo llegando a sus receptores a través de los capilares del sistema porta de la pituitaria ⁵¹. Esta hormona es considerada la principal estimuladora de la síntesis y secreción pulsátil de LH y FSH ⁵².

La administración pulsátil de GnRH exógena puede estimular pulsos fisiológicos de LH endógena para inducir fases foliculares competentes en mujeres ⁵³, primates, yeguas en anestro avanzado ⁵⁴ y liebres, entre otras especies ⁵⁵.

En la perra doméstica se han realizado varios estudios para demostrar el potencial que tiene la administración de GnRH para inducir estro fértil ³¹, los resultados han sido variables con tasas de fecundidad que van del 25 al 80% de éxito ^{13, 57, 58}. La relación entre la respuesta de proestro, estro, ovulación y preñez y las dosis usadas de GnRH demuestran una clara relación dosis - respuesta. Los pulsos de 290 a 500 ng/kg son más efectivos que dosis menores. Los pulsos de GnRH cercanos a 300 ng / kg cada 90 minutos parecen ser una forma confiable para inducir proestro y estro con la posibilidad de obtener un alto porcentaje de preñez si se aplica a perras en la última etapa del anestro ⁵⁶, debido a que durante el curso de esta etapa se incrementa la sensibilidad de la pituitaria a la GnRH en la perra y el ovario responde acordeamente ^{53, 56}.

La capacidad para inducir proestro rápidamente con la administración pulsátil de GnRH, está fundamentada en el incremento de las pulsaciones de LH en el final del anestro en el ciclo reproductivo natural de las perras. Similarmente, la administración pulsátil de GnRH puede proveer patrones de pulsos fisiológicos de LH endógena para inducir fases foliculares fértiles en las mujeres y en primates no humanos, sin embargo, puede ser que dichos pulsos no sean el único estímulo que provoque la secreción intermitente de las gonadotropinas endógenas que estimulan el desarrollo fisiológico de folículos preovulatorios ⁵⁸.

También han sido probados los productos hormonales agonistas de GnRH para inducir estro y ovulación. En el caso del lutrelin utilizado en 24 perras durante el anestro (90 a 146 d después del estro) y administrado por vía subcutánea a dosis de 24 g, dosis total por día durante 14 a 28 d, se indujo proestro en 21 perras, el estro en 19 y gestación en 9 de 24 perras ⁵.

La colocación de bombas subcutáneas que liberan un agonista de GnRH o GnRH puede aprovecharse experimentalmente en perros, pero no son prácticas para la clínica por la dificultad para mantener la administración intravenosa y los daños al equipo provocados por los perros que en ocasiones intentan quitárselo ^{5, 51}.

3.9.B. Uso de gonadotropinas para inducir estro

Las gonadotropinas son hormonas que tienen afinidad por las gónadas. La hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) se producen en las células gonadotropas de la pituitaria anterior pero también la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la gonadotropina coriónica equina (eCG) son hormonas que estimulan al ovario y actúan como LH y FSH respectivamente, producidas en la placenta de mujeres y yeguas ⁴⁴.

En el desarrollo folicular basal de algunas especies la respuesta de las células de la granulosa a FSH es baja, sin embargo su efecto estimulante probablemente es indirecto. El efecto de la FSH en la proliferación de las células de la granulosa

puede estar explicado por dos mecanismos diferentes, pero no exclusivos:

1° La FSH puede incrementar la respuesta de las células de la granulosa al factor de crecimiento (IGF) y aumentar la expresión de los receptores del IGF - 1 en células de la granulosa ⁶⁰.

2° Recientemente se propuso que la acción de la FSH en el crecimiento folicular, específicamente para la proliferación de células de la granulosa, es mediada por diversos factores de crecimiento ⁶¹. Por el contrario, en la regulación del desarrollo terminal de los folículos existe una estricta dependencia a las gonadotropinas para iniciar la oleada folicular, el proceso de selección del folículo dominante y la maduración del folículo preovulatorio ⁶². En la actualidad está bien establecido que la FSH es la llave para inducir la diferenciación terminal de las células de la granulosa, esta hormona induce la expresión de receptores para LH, FSH, enzimas esteroideogénicas (aromatasa), diferentes péptidos como inhibina, IGF - 1 y la interleucina 6 entre otros ⁶³. La FSH es la que organiza el desarrollo folicular terminal *In vivo* ²².

La LH estimula las células de la teca para producir andrógenos que al difundirse a través de la membrana basal se convierten en estrógenos por la aromatización en las células de la granulosa, además estimula la maduración terminal de los folículos y mantiene la dominancia folicular con el pico preovulatorio. La LH, estimula la ovulación, formación del cuerpo lúteo y producción de progesterona ^{44, 22}.

Bajo los conceptos antes mencionados la administración de gonadotropinas exógenas o la inducción de liberación de FSH endógena estimula el crecimiento folicular terminal. la administración farmacológica de FSH o LH solas en perras puede inducir el proestro y estimular el crecimiento folicular ⁶⁴, sin embargo, generalmente en las investigaciones donde se usó gonadotropina coriónica han tenido mejores resultados respecto al porcentaje de ovulación ^{17, 31, 50, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72}, que aquellos donde se usaron gonadotropinas de origen pituitario ^{73, 74, 75, 76, 77}.

Se han valorado diversos esquemas de inducción con gonadotropinas. en un experimento se logró el 100% de éxito con 12 perras, utilizando dietilelestrol (5mg por vía oral diariamente hasta el momento en que hubo secreción vaginal sanguinolenta) además una sola dosis de 5 mg de LH por vía intramuscular el primer día de estro y 10 mg de FSH intramuscular dos veces al día los días 5, 9 y 11 contados a partir del inicio del proestro ³¹.

Al utilizar gonadotropinas placentarias (hCG y eCG) para inducir estro hay varias complicaciones cuando el tratamiento con eCG se prolonga por 10 d y además se administra una dosis de hCG en el 10° día. Hay descargas abundantes de

secreción vaginal sanguinolenta, en una perra se observó anorexia y fiebre 30 d después de iniciar el tratamiento y la hematología reveló una anemia no regenerativa, trombocitopenia severa y granulocitopenia; en ella los niveles de progesterona llegaron a 599 pg/ml en el día 10 después de iniciado el tratamiento. El tratamiento con eCG por un periodo de 5 d y una sola dosis de hCG, reduce la incidencia de hiperestrogenismo, no provoca secreción vaginal anormal; los leucocitos, eritrocitos y trombocitos se mantienen dentro de rangos normales y además hay incremento en la fertilidad ⁵⁰. En otros estudios donde se utilizaron estos productos hormonales llegaron a tener éxito en el 80% ¹⁷, 64% y 75% ⁷⁸.

3.9.C. Inducción con agonistas de la dopamina

La supresión de prolactina con agonistas de la dopamina puede provocar acortamiento en la etapa de anestro o inducción del estro en perras con un anestro prolongado ⁴¹. La supresión de prolactina por la administración de dopamina agonista inhibe la función lútea y reduce las concentraciones séricas de progesterona hasta acercarse al límite de la detección en perras preñadas y no preñadas. Así la supresión de la prolactina por la administración de la dopamina agonista provoca el término de la preñez en las perras ⁴⁰.

La bromocriptina (parlodel) es un alcaloide del cornezuelo de centeno agonista de la dopamina disponible en el mercado para uso en seres humanos. La secreción de prolactina se regula mediante supresión de la dopamina hipotalámica; es decir, sin dopamina se secreta prolactina y debido a que la bromocriptina estimula la secreción de dopamina, suprime indirectamente la síntesis y secreción de prolactina. Esta es una hormona luteolítica ¹³, por lo que se ha intentado reducir el intervalo interestro con bromocriptina aunque investigaciones recientes indican que este fenómeno no está explicado solo por el descenso de secreción de prolactina ^{79, 80}. Otros estudios indican que el estro prematuro inducido con bromocriptina es asociado con cambios en el patrón de secreción pulsátil de FSH, su aplicación amplifica la secreción de FSH, sin un incremento concomitante en las concentraciones basales de LH ^{80, 81}. La duración media de los pulsos de FSH (120 min), es significativamente más larga que la de LH (80 min). El intervalo entre ciclos en las perras tratadas con bromocriptina fue significativamente más corto que el de los ciclos precedentes, la concentración plasmática basal media de FSH (7.4 ± 0.6 contra 6.1 ± 0.7 UI/l) se incrementó significativamente después del inicio del tratamiento con bromocriptina. En contraste con la diferencia en concentración plasmática basal media de LH ⁸⁰.

Administrando 0.6 - 2.5 mg de bromocriptina por perra hasta 3 ó 6 d después de la presentación del estro, se induce el estro fértil y por lo tanto se han obtenido camadas con este fármaco ⁸¹, pero no hay estudios comparativos respecto a esta respuesta debido a que el enfoque está relacionado con la reducción del intervalo interestro ^{80, 79} o como abortivo eficaz después del día 35 de la gestación ¹³.

En la experiencia hasta el momento, la bromocriptina produce efectos secundarios como anorexia, inapetencia, vómito y depresión y no es bien tolerada ¹³.

El tratamiento con metergoline durante el anestro (0.1 mg/kg cada 12 h, por vía oral hasta el primer día de proestro) ha sido administrado para medir el efecto sobre el intervalo entre estros, pensando que por ser un agonista de la dopamina puede comportarse como la bromocriptina, los resultados indican que a pesar de la disminución en los niveles séricos de prolactina similares a los obtenidos con bromocriptina el intervalo interestro no difiere con el intervalo del ciclo natural previo al tratamiento, indicando que la inducción del estro por agonistas dopaminérgicos no es iniciada por la supresión en la secreción de la prolactina pero si probablemente por otros efectos dopaminérgicos ⁷⁹.

3.9.D. Inducción con antagonistas de la prolactina

La cabergolina al igual que la bromocriptina, es un alcaloide del cornezuelo de centeno antagonista de la prolactina, es un fármaco de administración oral o parenteral muy potente y de acción prolongada que ha sido administrado en perras durante la etapa lútea plena para reducir los niveles séricos de prolactina (hormona luteotrópica) ^{13, 41}. Ha demostrado reducir la producción de leche o terminar con la etapa de lactación, suprime la pseudo preñez y puede usarse para inducir aborto y reducir el intervalo entre ciclos. Este alcaloide disminuye las concentraciones de progesterona a 1ng/ml dentro de los 15 a 20 d del tratamiento. La administración de 5 g/kg de peso vivo administrado por 2 d más después de haber logrado la inducción al proestro, reduce el intervalo interestro de 66.5 ± 7.1 d contados a partir del pico de LH previo, sin embargo ninguna de las perras tratadas quedó gestante en el ciclo inducido, probablemente por falta de involución uterina ⁸². En otro estudio también se administró 5 g/kg de peso vivo de cabergolina diariamente durante 5 d después de haber considerado que era la dosis óptima por producir un mínimo de efectos secundarios (vómito). Esta dosis produjo luteólisis parcial en la primera mitad de la gestación y fue totalmente luteolítica en la segunda mitad de la gestación ⁴¹.

3.10. INSEMINACIÓN

El depósito del semen en el aparato reproductor de la hembra sin participación del macho fue realizada por primera vez en una perra, fue en 1779, por el italiano Lázaro Spallanzani ²³.

Los métodos para la recolección del semen básicamente son 3: manual, vagina artificial y electroeyaculación. Por lo general la recolección en perros no es problema y basta con la estimulación manual. Con la técnica manual es necesario tener como equipo un tubo de ensaye, una copa colectora, embudo o cono de látex

estériles y jalea para lubricar el pene ^{13, 23}.

El procedimiento consiste en dar un manejo suave al prepucio para estimular la primera fase de erección y como consecuencia que el bulbo peneano comience a aumentar de tamaño. El pene se exterioriza con la mano enguantada en la segunda fase de la erección y después de los movimientos pélvicos (5 a 15 s) que acompañan el inicio de la eyaculación es necesario girar el pene 180° con la finalidad de simular el abotonamiento (unión reproductiva de la hembra y el macho por la dilatación del bulbo peneano); en esta etapa el perro eyacula la segunda fracción, pero en algunos perros las fracciones seminales son depositadas casi al mismo tiempo. La recolección del semen puede durar 2 a 5 min porque la tercera fracción suele adicionar volúmenes de líquido excesivo que diluyen el semen ^{13, 23}.

Una vez que se logra la colección del semen, el resto del procedimiento es bastante simple. El semen se coloca en una jeringa y se conecta a una sonda uretral o pipeta de inseminación estériles, se limpian perfectamente los genitales de la hembra y se introduce suavemente la pipeta entre los labios vulvares hacia la cúpula vaginal, hasta la constricción que existe entre la vagina y el vestíbulo. En la perra no es posible atravesar con la sonda el vestíbulo hacia el útero sin anestesia, por la anatomía del cuello uterino. El semen se deposita suavemente y lo más profundo posible para que quede lo más cercano al cérvix, la inseminación intrauterina se realiza por laparotomía o laparoscopia, pero no resulta muy práctico. Una vez que termina la inseminación, las patas traseras de la perra deben levantarse en posición de carretilla para ayudar a que fluya el semen hacia el cuello uterino ^{13, 23}.

3.11. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

3.11.A. Recolección de embriones

Existen diferentes técnicas quirúrgicas y no quirúrgicas para la recolección y transferencia de embriones entre ellas la laparoscopia, laparotomía media ventral y la transcervical.

La técnica por laparotomía se considera más invasiva porque requiere de una incisión por el flanco o en la línea media del abdomen con la finalidad de exponer el útero de la hembra ²⁰.

La técnica no quirúrgica transcervical consiste en introducir la sonda de Foley a través del conducto vaginal, a veces con ayuda de un dilatador vaginal y con un estilete rígido de acero inoxidable para dar rigidez a la sonda y facilitar el paso por el cérvix, se guía hacia el cuerno uterino y se coloca entre el tercio medio y el anterior. Se infla el globo con aire o solución salina para permitir el paso del medio de lavado por gravedad, en cantidades dependientes del tamaño de los cuernos

uterinos, raza y edad, procurando que haya presión sobre las paredes del endometrio para que se desprendan los embriones de sus pliegues. Se procede a desalojar el líquido contenido en el cuerno con una manguera conectada a una "Y" en la salida de la sonda. El medio cae por gravedad a un filtro o malla de teflón; el lavado se realiza unas seis veces en ambos cuernos uterinos. El filtro se enjuaga una o dos veces y el líquido se deposita en cajas de Petri para la búsqueda de los embriones utilizando el microscopio estereoscópico ^{7, 11}.

En la técnica con laparoscopia se hacen dos incisiones en la pared abdominal para la inserción del laparoscopio y para el manipulador de vísceras. Una vez localizado el útero, se inserta una cánula en la línea media y se introduce una aguja roma para hacer una pequeña incisión en la pared uterina caudal. Posteriormente se remueve la aguja y se inserta una sonda de Foley con un estilete metálico a través de la cánula de manera que queda dentro del lumen uterino. Se insufla el balón de 3 ml en el catéter y se remueve el estilete, en el extremo opuesto del cuerno se inserta un catéter intravenoso con estilete, se remueve el estilete para permitir el paso del medio de recolección y recuperarlo a través de la sonda de Foley ⁸³. Esta técnica se considera menos invasiva que la laparotomía porque no hay necesidad de exteriorizar el útero, la manipulación es menor y las incisiones son más pequeñas por lo tanto la recuperación es más rápida.

En caninos la recolección de embriones se ha realizado con diferentes técnicas quirúrgicas, entre las que se pueden mencionar:

- a) La ovario histerectomía o histerectomía para el posterior lavado de los cuernos uterinos y oviductos ^{7, 24}.
- b) La técnica de Louis Foley con laparotomía en la perra consiste en introducir la sonda de Foley (8FR ó 10FR) con un estilete rígido, desde el orificio vulvar para guiarlo a través de la incisión abdominal con el dedo índice 2 ó 3 cm más allá del canal vaginal, para permitir el drenaje, por otro lado se introduce un cateter hasta alcanzar la luz del útero para inyectar aproximadamente 10 ml del medio de lavado. El medio es recuperado en cajas de Petri o filtros a través de la sonda de Foley; cada cuerno se lava 3 veces ^{17, 84}.
- c) La modificación de la técnica de Louis Foley necesaria para introducir el catéter en perras con cervix muy estrecho a través de una pequeña incisión aproximada de 0.5 cm a nivel del cuerpo uterino para guiar desde ahí la sonda hacia los cuernos y proceder al lavado ⁸⁴.

3.11.B. Transferencia de embriones

El éxito de la transferencia de embriones depende en gran medida de su evaluación, debido a que las anomalías se relacionan con bajo porcentaje de gestación. Los principales criterios utilizados para la evaluación de los embriones son: el estadio de desarrollo de acuerdo con el tiempo, blastómeros extruidos, número y compactación de células, color, irregularidades e integridad de la zona pelúcida y presencia de restos celulares en el espacio perivitelino. De acuerdo a las características antes mencionadas se clasifican en:

- a) calidad 1 o excelente: embrión compacto, esférico, desarrollo adecuado a su edad pocas vesículas, sin desechos celulares, sin blastómeros extruidos (tal vez uno pequeño).
- b) calidad 2 o bueno: embrión compacto o con leve descompactación, poco irregular, desarrollo adecuado a su edad, presencia de vesículas pero no abundantes, con algunos blastómeros extruidos (uno grande o algunos pequeños), con pocos desechos celulares, color uniforme (tal vez un poco oscuro o zonas claras u oscuras, pero no muy marcadas).
- c) calidad 3 o regular: descompactación marcada, desechos celulares, blastómeros extruidos, color oscuro o con zonas claras y oscuras, presencia de vesículas, masa pequeña pero no menor al 50% de lo normal.
- d) calidad 4 o no transferibles: marcada degeneración, masa pequeña menor al 50% de lo normal, descompactación, retraso en el desarrollo (más de dos días), color oscuro, zonas claras y oscuras e irregularidades en los blastómeros⁹.

En algunas especies para la evaluación de embriones se han utilizado métodos de laboratorio morfológicos, pruebas bioquímicas, desarrollo *in vitro* e *in vivo*, tinciones, estudios especializados de morfometría, ultraestructura, cinematografía y estudio de anomalías cromosómicas principalmente con fines de investigación¹¹, sin embargo en los cánidos el desarrollo de la técnica de transferencia de embriones tiene un pobre desarrollo y las investigaciones están dirigidas a la base de las técnicas de reproducción asistida^{2, 8, 40, 68}; como son los requerimientos hormonales para el desarrollo del embrión^{40, 68}, técnicas para su recolección², sitio de la transferencia¹² y transferencia de embriones en diferentes estadios es lo que ocupa actualmente a los investigadores^{2, 7, 12}.

Takeishi fue el primer investigador que reportó un caso exitoso de transferencia de embriones en perras y posteriormente otros autores realizaron diversos estudios de transferencia embrionaria en perras.^{2, 7, 8} Utilizando 6 perras (tres donadoras y tres receptoras), recolectaron 1 mórula, y el resto en estado de blástulas 9, 11 y 12 d respectivamente después de la ovulación. Los embriones se transfirieron a la

punta del cuerno uterino; 8 embriones a una perra, y 5 a cada una de las otras dos; únicamente 1 de las 3 receptoras parió 2 cachorros⁷.

En un segundo estudio se demostró que la preñez puede ser inducida por la transferencia de embriones de 8 células y blástulas, en perras con asincronía de 1 ó 2 días. Los embriones recolectados 8 a 11 d después de la ovulación fueron transferidos (1 a 10 embriones por perra) en estado de desarrollo desde 8 células hasta blástulas. Solo 10 perras llevaron a término la gestación y parieron un total de 22 cachorros y una de las 14 perras que recibieron mórulas quedó gestante y parió 3 cachorros².

Pocos estudios han aportado conocimientos referentes a la transferencia de embriones en estado temprano de desarrollo. La recolección entre los 3 y 7 d después de la ovulación (1 a 4 d después de la monta) permitió coleccionar embriones de 1, 2, 4, y 8 células. Los embriones recolectados 3 a 4 d después de la ovulación se transfirieron dentro del cuerno uterino a 1.5 cm de la fimbria, y los que se coleccionaron 5 a 7 d después de la ovulación fueron transferidos a 5 cm de las fimbrias. Ninguna de las 7 perras que recibieron embriones en estado de cigoto produjeron cachorros. Se consideró un mayor éxito en el índice de fertilidad en las perras en las cuales se depositaron los embriones a 5 cm de distancia de la fimbria, dentro del útero, con diferencia de ± 1 en el día de ovulación entre la donadora y la receptora¹².

Sin embargo con métodos quirúrgicos (laparotomía), fueron transferidas 8 embriones en estado de mórula a una receptora que parió dos cachorros⁷. En otro estudio los embriones recolectados entre los días 14 y 15, contados a partir del primer día del estro, sumaron 28 y fueron transferidos a cinco receptoras; dos quedaron gestantes, produciendo camadas de uno y dos cachorros respectivamente¹¹.

4. HIPÓTESIS

1. En perras inducidas al estro es factible la recolección, transferencia e implantación de embriones para obtener gestaciones exitosas.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVOS GENERALES

1. Inducir estro con ovulación en perras y obtener embriones aptos para ser transferidos con la técnica de laparoscopia (utilizada en borregas) a perras domésticas receptoras.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

5.2.A Recolectar embriones de las perras donadoras inducidas al estro.

5.2.B. Determinar la etapa de desarrollo de los embriones recolectados a los 12 y 14 d después de la inseminación.

5.2.C. Transferir los embriones con ayuda del laparoscopio a hembras receptoras inducidas al estro, usando la técnica implementada en borregas

5.2.D. Comprobar si dichos embriones terminan su desarrollo.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Pequeñas Especies y en el Laboratorio de Fertilización *in vitro* del Departamento de Reproducción, ubicados en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se utilizaron 10 machos evaluados andrológicamente y 18 perras mestizas con pesos de 8 a 25 kg, con 8 meses (sin ningún ciclo reproductivo) a 2 años de edad aproximadamente (basada en las características de dentición y en la información que dieron los dueños). En el criterio de selección se consideró: ausencia de signos de enfermedad sistémica, nivel de progesterona sérica basal (0.5 ng/ml) para considerar que estaban en etapa de anestro, y citología con patrón predominante de células parabasales. Se manejaron 2 perras por jaula y se trabajó con grupos de 6 perras para evitar estrés por hacinamiento.

6.1. TRATAMIENTOS

Las perras seleccionadas pasaron por tratamiento de desparasitación con 5 mg/kg de peso vivo de ^atetrahidropirimidina, 2 veces a intervalo de 15 d, su alimento consistió de una ración diaria de ^balimento comercial y agua *ad libitum*. Permanecieron sin aplicación hormonal por un periodo de 1 mes para su adaptación. Para inducir las al estro y ovulación se utilizó el tratamiento hormonal propuesto por Arnold et al. ⁵⁰ que consiste en administrar 20 UI de ^ceCG/kg de peso corporal por vía i.m. por 5 d consecutivos y 500 U.I de ^dhCG (dosis total) por vía i.m. al 5° día del inicio del tratamiento.

6.2. SEGUIMIENTO CON PROGESTERONA

Para dar seguimiento a la respuesta hormonal, periodo fértil y momento de ovulación, se tomaron muestras de sangre de la vena cefálica en ^etubos heparinizados, diariamente durante el tratamiento y cada tercer día después del tratamiento hasta el momento de la recolección de embriones en las perras donadoras y hasta el diagnóstico de gestación definitivo en las receptoras (30 d después de la transferencia de embriones). La sangre se centrifugó para obtener el plasma, mismo que se conservó en congelación (-20° C) hasta el momento de medir los niveles de progesterona con la técnica de RIA, ^fel kit comercial tenía una

^a Vermiplex de Holland de México

^b Proplan de Purina

^c Foligon 1000 U.I de Intervet, S.A

^d Chorulon 5000 U.I de Intervet, S.A.

^e Becton Dickinson

^f kit comercial de Diagnostic Products Corporation (DPC)

sensibilidad de 0.1 ng/ml y un coeficiente de variación del 6.35 %. Esta medición hormonal se utilizó para inferir sobre el periodo fértil. Cuando los niveles de progesterona estuvieron entre 1 a 2 ng/ml se consideró el pico de LH, entre 2 y 10 ng/ml se consideró como el periodo fértil, y caídas de 2 ng/ml durante el supuesto diestro fueron consideradas como maduración deficiente del cuerpo lúteo e incapacidad para mantener la gestación ².

6.3. SEGUIMIENTO CON CITOLOGÍA VAGINAL

Con la finalidad de dar seguimiento práctico a las respuestas estimuladas por las hormonas inductoras, se hicieron citologías vaginales 3 d antes del tratamiento, diariamente mientras se aplicó el tratamiento y cada tercer día después de terminar la aplicación de hormonas, hasta el momento de la recolección de embriones (12 y 14 d después de la primera monta).

El porcentaje de células epiteliales fue calculado con la finalidad de iniciar la inseminación artificial cuando las células superficiales conformaran el 80% o más de las células exfoliadas de la vagina ¹³. La citología vaginal fue obtenida con un hisopo de 15 cm de longitud, el extremo con la punta de algodón, se introdujo por la comisura dorsal de la vulva y avanzando en dirección cráneo dorsal hacia la columna vertebral se atravesó el vestíbulo hasta llegar a la vagina; se procedió a girar el hisopo en ambas direcciones y una vez colectadas las células fueron colocadas con suavidad girando el algodón sobre un porta objetos ⁴⁷. Las laminillas con células se sumergieron durante 5 min en una solución de alcohol al 95% para evitar deterioro o distorsión celular. Dichas laminillas se tiñeron con el colorante de ^hDiff-Quik, éste consiste de dos soluciones, una eosinofílica (roja) y una basofílica (azul); las laminillas permanecieron por un periodo aproximado de 5 a 10 s sumergidas antes de ser colocadas sobre agua corriente para su observación. Las células fueron clasificadas en 3 grupos: parabasales, intermedias y superficiales (Las superficiales con núcleos pequeños y anucleadas se consideran de un solo grupo) ^{13, 47, 85}.

6.4. EVALUACIÓN DE LOS MACHOS

Los machos fueron seleccionados un mes antes de ser utilizados, la selección fue basada en el examen físico y evaluación de semen, el cual se obtuvo por masturbación con un cono de látex unido al tubo de vidrio. Se dio masaje en el pene a través del prepucio, y una vez estimulado se procedió a retraer el prepucio sobre el glande. Tan pronto como se obtuvo, se valoraron las dos primeras fracciones del semen, macroscópicamente (volumen y color) y microscópicamente (motilidad, concentración y morfología) ^{13, 23}.

^g DEQUINSA, S.A. de C.V.

^h Laboratorio Hycel

Fueron consideradas las siguientes características para la inclusión de los machos al estudio: volumen de eyaculado no menor a 1.5 cm, el color aceptado fue gris o blanco, opalescente y opaco; la motilidad de los espermatozoides con un promedio de 70% de progresividad mínima y desplazamiento en espiral; respecto a la morfología se aceptó un máximo de 20 % de espermatozoides anormales ^{13, 23}.

La concentración espermática es el número de espermatozoides por mililitro de semen en el eyaculado. Se determinó multiplicando la concentración por el volumen total colectado en mililitros contados en una cámara de Neubauer 1/10 mm. En una pipeta cuenta-glóbulos se mezcló suavemente el semen y una dilución de formol al 10% de 1:100 dentro del capilar, después, con la mezcla se llenó la cámara del hemocitómetro. La cámara tiene 9 cuadrantes primarios pero la contabilización de los gametos se realizó en los 4 cuadros de los extremos y el cuadrante central secundario. El número de espermatozoides contados se multiplicó por 10^6 para obtener la cifra de espermatozoides por mililitro de eyaculado y por último se multiplicó por el volumen de eyaculado para obtener el número total de espermatozoides y solo se aceptaron perros que tuvieran más de 300 millones ^{13, 23}.

6.5. MOMENTO DE LA INSEMINACIÓN

Cuando la citología vaginal de las perras mostró 80% o más de células superficiales, fueron inseminadas cada tercer día hasta un día antes de la recolección embrionaria (día 11 ó 13) o cuando terminaron el estro citológico en los casos donde tuvo una duración menor. Se decidió inseminar a todas las perras para evitar contratiempos por falta de receptividad sexual.

6.6. RECOLECCIÓN DE EMBRIONES

En el día 12 ó 14 después de la primera inseminación las perras fueron sometidas a una laparotomía media, previa aplicación de ⁱHidrocloruro de xilazina (0.1ml/kg de peso corporal por vía i.m.) como tranquilizante y Ketamina 15 mg/kg de peso corporal por vía endovenosa como anestesia, para realizar la ovariectomía y recolectar los embriones.

Se procedió a lavar la luz del cuerno uterino y oviductos con solución de ^kDulbecco (PBS) y 10% de albúmina sérica bovina para recolectar los embriones en el ^lfiltro concentrador. Posteriormente fueron trasladados momentáneamente a cajas de Petri estériles con 5 ó 10 ml de solución Dulbecco (PBS) y 10 % de albúmina sérica bovina. Al terminar los lavados se buscaron los embriones para identificar su

ⁱ Boeckel Co.

^j Rompun de Bayer de México, S.A. de C.V.

^k GIBCOBRIL

^l Agtech

etapa de desarrollo con ayuda de un microscopio estereoscópico con aumento de 10 a 12 X y de 40 a 50X⁸⁶.

En todas las perras donadoras que tuvieron signos de estro (11), se realizó ovario histerectomía con la finalidad de donarlas a propietarios particulares.

6.7. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

Una perra del primero y 2 del segundo grupo estuvieron privadas de alimento por 24 h y de agua por 8 h previas al manejo de anestesia para la transferencia de embriones con laparoscopia. Para anestesarlas se utilizó una combinación de Hidrocloruro de xilazina (0.1 ml/kg de peso corporal por vía i.m.) como tranquilizante y ^mKetamina 15 mg/kg de peso corporal por vía endovenosa para anestesia. Después de la preparación quirúrgica del área abdominal las receptoras fueron colocadas en la mesa quirúrgica. La cavidad abdominal fue insuflada con CO₂ a través de una aguja de 10 cm insertada en la línea media, aproximadamente a 1 cm craneal de la cicatriz umbilical. La cantidad de CO₂ administrado fue de 3 a 5 l.

El laparoscopia de 8 mm de diámetro con lente angular de 0 grados conectado a una fuente de luz fue insertado en el interior de la cavidad abdominal en la línea media aproximadamente 1 cm caudal a la cicatriz umbilical usando un trocar sin previa incisión de la piel. La cavidad abdominal fue visualizada y el cuerno uterino localizado craneal y dorsal a la vejiga urinaria.

Un segundo trocar (5 mm de diámetro) fue insertado, sin incisión quirúrgica de la piel, en el lado derecho del abdomen aproximadamente 2 a 3 cm lateral a la glándula mamaria, un fórceps endoscópico pasó a través de la cánula del trocar y fue usado para sostener el cuerno del útero con la finalidad de acercarlo a la pared abdominal y a través de un catéter 18G se insertaron los embriones en el lumen del cuerno uterino a 5 cm de la unión útero-tubárica en dirección al ovario.

6.8. DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN

Utilizando un ⁿequipo portátil de imagen ultrasonográfica de tiempo real bidimensional, equipado con un transductor de 5 y 3 MHz, se diagnosticó la gestación; después de aplicar suficiente gel en el abdomen de las perras y partiendo de la vejiga, el transductor fue movido hacia la dirección craneal para buscar a partir de los 20 d después de la transferencia, las vesículas intrauterinas, el movimiento y la ecogenicidad del latido cardiaco de los fetos en las perras receptoras²⁸. El diagnóstico ultrasonográfico fue realizado 2 veces más a los 27 y 34 d después de la transferencia.

^m REVETMEX, S.A. de C.V.

ⁿ Aloka SSD 500

7. RESULTADOS

7.1. SEGUIMIENTO DEL CICLO INDUCIDO CON CITOLOGÍA VAGINAL

El tiempo de respuesta al tratamiento fue variable; en el primer grupo de 6 perras una tardó 12 d en mostrar patrón citológico característico del proestro y secreción sanguinolenta, las 5 restantes tardaron 5 d contados a partir del inicio de la aplicación de eCG. En el segundo grupo hubo mayor variación: una no respondió al tratamiento, dos al quinto y las tres restantes al tercero, cuarto y sexto día. En el último grupo el periodo de respuesta se prolongó en 2 a 11 d, tres tardaron 10 d y una 9 d, el promedio de la muestra fue 7.11 d con una desviación estándar (S) de ± 3.02 d. (Ver gráfica 1)

Los signos que caracterizan el periodo de proestro (secreción y edema vulvar) fueron detectados en 17 de las 18 perras inducidas al ciclo (94 %), la duración de dicho periodo según el seguimiento citológico fue mínimo de 2 d, máximo 8 y en promedio 4.47 ± 1.80 d.

El estro citológico característico por la presencia de 80% o más de células superficiales se diagnosticó en 16 de 17 perras (94 %), de las cuales 5 se utilizaron como receptoras y 11 fueron inseminadas para utilizarlas como donadoras.

La duración del estro en las perras donadoras fue de 3, 5, 6, 8 y 10 d en 2, 3, 3, 2, y 1 perras respectivamente; en 5 perras la duración fue mayor a 10 d pero no se pudo determinar con certeza el tiempo porque cuando entraron a quirófano para el lavado aún estaban en etapa de estro.

7.2. MEDICIÓN PLASMÁTICA DE PROGESTERONA

El tiempo de respuesta medido a partir del primer día de tratamiento hasta el momento en que se observó el primer incremento hormonal fue en promedio 8 ± 2.97 d.

En 14 de 18 perras (77%), se detectaron niveles de progesterona de 2 a 10 ng/ml considerados como el rango del periodo fértil. (Ver gráficas 2 – 15)

Solo 7 perras donadoras y 3 receptoras superaron dicho nivel; de las 10, solo en 2 perras receptoras y 6 donadoras siguieron incrementándose los niveles hasta la última muestra (44% del total de perras inducidas). Dentro del grupo de las 6 donadoras que siguieron incrementando los niveles en forma constante, hasta el final del muestreo, había 2 hembras que si produjeron embriones.

Cinco perras de las que mostraron signología de proestro y luego de estro, fueron elegidas como receptoras y no se inseminaron para poder transferir embriones a su útero, pero únicamente se utilizaron 3, debido a que la recolección de embriones en el último grupo fue nula y las dos perras receptoras no pudieron recibir ningún embrión. En 2 de las 3 receptoras, los niveles de progesterona disminuyeron hasta 0.24 y 1 ng/ml 24 y 29 d respectivamente después de la transferencia.

En sólo 4 perras se pudo confirmar la fertilidad del ciclo inducido al recolectar embriones en el lavado de su útero. La perra no. 9, aunque no mostró un patrón de secreción de progesterona que indicara fertilidad durante el ciclo, produjo embriones que fueron recolectados en el lavado. (Ver gráfica 7)

7.3. RECOLECCIÓN DE EMBRIONES

En las 2 perras donadoras del primer grupo (no. 5 y 6) la recolección de embriones fue 14 d después de la primera inseminación, pero 16 y 12 d respectivamente contados a partir del día en que los niveles de progesterona fueron superiores a 2 ng/ml. En las 2 perras del segundo grupo (no. 9 y 10) la recolección de embriones fue 12 d contados a partir de la primera inseminación, pero 7 y 14 d considerados a partir del momento en que sus niveles de progesterona fueron mayores a 2 ng/ml.

El lavado de 13 perras dio como resultado la recolección de 22 embriones producidos por solo 4 de ellas. Los embriones recolectados de la perra no. 5 fueron en total 8: 2 embriones de 2 células, 2 de 4 células, 1 de 8 células, 2 blástulas maduras y 1 eclosionada.

En la perra no. 6 se recolectaron 5 embriones: 3 blástulas tempranas 2 en expansión.

La perra no. 9 produjo 4 blástulas eclosionadas.

La perra no. 10 dio 5 embriones: 1 blástula en expansión y 4 eclosionadas. (Ver cuadro 1)

La etapa de desarrollo de los embriones recolectados 12 d después de la primera inseminación fueron 9 blástulas: 8 eclosionadas y 1 en expansión, y los recolectados 14 d después de la primera inseminación fueron: 2 embriones de 2 células, 2 de 4 células, 1 de 8 células y 8 blástulas, todas blástulas eclosionadas.

(Ver cuadro 1)

El número de los folículos y cuerpos lúteos no pudieron determinarse con precisión por observación directa. En la superficie ovárica no era posible distinguir el número

y tipo de tejido. Por esta razón no se especificó el número de ovulaciones y la tasa de recolección.

7.4. DESARROLLO DE LOS EMBRIONES

Los 22 embriones recolectados fueron usados para la transferencia en tres perras. Las 2 donadoras (perras no. 5 y 6) y la receptora (no.1) del primer grupo iniciaron su estró citológico el mismo día y esta última recibió 13 embriones; la perra no. 9 donó 4 embriones y estuvo sincronizada con la receptora no.12, y la donadora no. 10 inició el estró citológico 3 d antes que la receptora no. 11, a la que le donó 5 embriones.

El seguimiento de los niveles de progesterona cada 7 d después de la transferencia en las perras que recibieron embriones, revela que la receptora del grupo 1 redujo la producción de esta hormona hasta 0.24 ng/ml en el día 41 después de que inició la respuesta hormonal al tratamiento y 24 d después de la transferencia. En la receptora no. 11 el último valor fue de 11.50 ng/ml 29 d después de la transferencia y 42 d después de que manifestó respuesta hormonal. La receptora no. 12 nunca alcanzó valores mayores de 7.20 ng/ml y 40 d contados a partir del inicio del proestro (29 d después de la transferencia) su progesterona disminuyó a 1 ng/ml.

La producción deficiente de progesterona durante el diestro se detectó en 2 de 3 perras que se utilizaron como receptoras. (Ver gráficas 2 y 10) Los niveles indican la incapacidad del cuerpo lúteo para mantener la gestación y por lo tanto el final de la fase lútea (concentraciones séricas menores a 2 ng/ml) ^{13, 14, 28.}

La medición de progesterona en la receptora no. 1 indicó el término de la etapa lútea con un descenso drástico que llegó a 0.29 ng/ml en el día 26 del diestro y en la receptora no. 12 a 1.0 ng/ml en el día 32 del diestro.

En todas las perras, el diagnóstico de gestación realizado con ultrasonido los d 20 y 30 después de la transferencia de embriones, fue negativo.

8. DISCUSIÓN

La biotecnología reproductiva desarrollada en la especie canina ha tenido un proceso muy lento si se compara con los adelantos obtenidos en las demás especies domésticas. Las particularidades anatómicas y los aspectos fisiológicos reproductivos aun sin dilucidar en la hembra canina han llegado a ser un obstáculo en los logros.

Los registros alentadores de investigaciones anteriores en los cuales mencionan que se puede obtener alto porcentaje de éxito en la preñez y reducidas complicaciones provocadas por hiperestrogenismo, cuando se utiliza eCG 20 UI/Kg/día durante 5 d más y 500 UI de hCG al quinto día en dosis única^{31, 60, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72}, no coinciden con los resultados de presente estudio. Arnold *et al.* obtuvieron 50% de éxito en la preñez manejando un tamaño de muestra de 6 perras⁵⁰, sin embargo en la presente investigación fue de 30% si se considera que de las 18 perras inducidas, 5 fueron receptoras, quedando 13 de las cuales en solo cuatro se recolectaron embriones. El éxito en la preñez (cachorros paridos) fue nulo y es de importancia mencionar que en dos de las perras receptoras existió un factor de causa que pudo estar directamente relacionado con el deficiente desarrollo del cuerpo lúteo y por lo tanto con el protocolo de inducción que se reflejó en los bajos niveles de progesterona (1 y 0.24 ng/ml) durante el periodo posterior a la transferencia de embriones.

Otras investigaciones sobre inducción al estro con hormonas gonadotrópicas placentarias informan de sus resultados exitosos basándose en el porcentaje de perras que mostraron signos de proestro y estro (75, 80, 64 y 56%)⁷⁸. Si los resultados de este trabajo los comparamos con esos porcentajes, entonces estaríamos rebasando dichos valores al haber obtenido 88% de respuesta al tratamiento, sin embargo estos resultados son subjetivos, porque al hacer un análisis más profundo basado en los niveles de progesterona y recolección, revela la ausencia de ovulación en algunas perras y la falta de desarrollo y maduración de los cuerpos lúteos.

Medir o comparar el éxito en la inducción del estro resulta difícil debido a la variación que existe en cada investigación; se utilizan muestras diferentes (No. de muestra, estado reproductivo, perras de raza o mestizas, fértiles o con anestros prolongados). Incluso con protocolos similares, las variables de medición y el criterio de éxito son diferentes³¹. La evaluación de la respuesta ovárica en ocasiones está basada en el comportamiento sexual, cornificación vaginal, número de cachorros paridos y niveles hormonales alcanzados entre otros³¹. Es posible determinar en este estudio algunos valores que muestran la variabilidad con base en los diferentes criterios: en 88% se indujo estro, sin embargo en solo el 30%

(perras que produjeron embriones), fue posible confirmar con certeza la fertilidad.

Otro aspecto importante que se refiere a los productos hormonales es la calidad de producción y el manejo que se da después de la producción, estos son detalles que influyen sobre la respuesta al tratamiento y quizá pueda explicar los diferentes resultados que muestran las investigaciones que tienen esquemas iguales. Las gonadotropinas son productos que varían en su potencia de manera significativa de acuerdo con el laboratorio donde se fabricaron, cómo fueron preparadas y la manera en que se manejaron después de su preparación (cadena fría)¹³. Los resultados pueden ser controversiales debido a diferencias en la potencia de las hormonas⁷². En relación con este aspecto, cuando se compararon los resultados de los tres grupos manejados con el mismo protocolo y con condiciones muy similares, se detectó que justo el tercer grupo, manejado con hormonas de otro lote, respondió de manera diferente en el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento hasta el momento en que se presentaron los signos de proestro. El periodo de respuesta al tratamiento se prolongó a 9.2 d en promedio y la producción de embriones fue nula. (Ver gráfica 1)

8.1. ANÁLISIS DE CITOLOGÍA VAGINAL

A pesar de que la citología vaginal es un recurso práctico y útil para recomendar el momento de la monta o cruce, no ayuda a identificar el día exacto de la ovulación¹³. La citología vaginal no permite distinguir entre el proestro tardío y el estro, se ha calculado que aproximadamente 70% de los periodos naturales de estro diagnosticados con citología, coinciden con los valores hormonales de progesterona de este periodo (a partir de 1 a 2 ng/ml), 25% alcanzan primero niveles ovulatorios de progesterona 2 a 3 d antes de que en la citología haya más del 60% de células superficiales y en 4.2% se alcanzan niveles ovulatorios 4 d después de la máxima producción de las células superficiales⁴⁷. Hay un promedio de cuatro a cinco días consecutivos en los que no pueden diferenciarse las dos fases con base en la citología vaginal¹³.

En las perras inducidas aún no hay parámetros que permitan valorar la certeza de esta herramienta, en este estudio la coincidencia del inicio de estro con ayuda de la citología vaginal y los niveles de 1 a 2 ng/ml de progesterona sucedió en 7 de las perras tratadas. La perra no. 18 mostró estro positivo en la citología, sin embargo solo una de las muestras de sangre registró 1.24 ng/ml de progesterona y los demás niveles estuvieron por debajo de 0.5 ng/ml, motivo por el cual se considera que el epitelio de la vagina únicamente estaba bajo la influencia de estrógenos^{13, 49, 47} y por lo tanto se observan signos de proestro, pero los bajos niveles de progesterona indican que en realidad no fue inducida al ciclo^{32, 48}. (Ver cuadro 2)

Tomando en cuenta estos aspectos es importante mencionar que la citología vaginal, por si sola, en casos donde se pretende recolectar y transferir embriones de perras inducidas no proporciona información confiable referente a la inducción del estro fértil y menos sobre la edad del desarrollo embrionario; desafortunadamente en el caso de la transferencia de embriones el momento del pico de LH, ovulación y día de monta o inseminación son importantes para determinar el momento óptimo de recolección embrionaria.

8.2. ANÁLISIS DE PROGESTERONA EN PLASMA

Los parámetros de la progesterona plasmática ayudan a deducir el estado reproductivo de las perras con ciclos naturales ¹³, sin embargo en las perras inducidas al estro las concentraciones de progesterona muestran extrema variabilidad ^{23,31,72}.

Shille mencionó, en su estudio de inducción hormonal con gonadotropinas placentarias, que los niveles de progesterona declinaron a valores basales a los 25 a 30 d después del inicio del estro ³¹. En el presente estudio 2 perras alcanzaron niveles que indicaron el inicio del estro (1 a 2 ng/ml) ^{24,35}, pero no la ovulación (2 a 10 ng/ml) ¹⁶. En 8 perras los niveles pudieron considerarse como ovulatorios, sin embargo descendieron nuevamente ¹³. Este comportamiento hormonal corresponde a una función lútea inadecuada que quizá solo haya inducido la hCG del tratamiento, pero que quizá no represente la etapa de maduración del folículo ⁵⁰.

De manera indirecta si el estro no es seguido por un periodo típico de 60 a 90 d de predominio de progesterona se considera que no hubo ovulación ¹³. Sin embargo en las perras inducidas es un aspecto que debe ser estudiado con más profundidad, aunque las concentraciones de progesterona plasmática declinan durante el diestro a valores basales después del tratamiento indicando que la inducción de la formación de los cuerpos lúteos es inadecuada para mantener la preñez, no necesariamente significa que no hubo ovulación. En la donadora número 10 los valores de progesterona superaron los 2 ng/ml, produjo embriones y no superó más de 2.74 ng/ml.

La posibilidad de predecir la ovulación en ciclos naturales con base en los niveles de progesterona ha sido sugerida por varios autores ^{87, 88, 89, 90, 91, 92}. Es necesario, en la inducción hormonal, considerar la posibilidad de que la producción de progesterona se deba a un proceso de estimulación diferente, por ejemplo la estimulación hasta un determinado grado de desarrollo de muchos folículos que no llegan a su desarrollo terminal pues en los ovarios de las perras inducidas se observaron abundantes folículos que eran imposibles de contar.

Solo en 8 de 18 perras la secreción de progesterona se mantuvo en incremento hasta el momento en que se tomó la última muestra de sangre, pero el seguimiento hasta los 30 d después de la ovulación únicamente pudo ser posible en las perras receptoras porque en las donadoras se realizó ovariectomía. (Ver gráficas 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15).

Se han desarrollado varios métodos para predecir la ovulación en la perra, pero pocos se han basado en la observación directa de la maduración folicular y ovulación⁹¹.

Aunque la citología vaginal es un método práctico para diagnosticar el inicio del periodo de celo para iniciar la inseminación, la progesterona se consideró para determinar el periodo fértil y los días aproximados de desarrollo embrionario. En algunas perras el inicio de la inseminación y del periodo fértil coincidieron, pero en otras hubo desfases. En las donadoras número 5 y 6, se realizó la recolección embrionaria 14 d después de que la citología vaginal tuvo más de 80% de células superficiales (inseminación), sin embargo 17 y 12 d respectivamente después del inicio del periodo fértil (2 ng/ml). En las perras número 9 y 10 se recolectaron los embriones 12 d después de la inseminación, pero se colectaron 7 y 13 d después del inicio del periodo fértil. (Ver cuadros 3 – 6)

8.3. RECOLECCIÓN DE EMBRIONES

En el presente estudio no se intentó realizar la recolección de los embriones con la canulación transcervical (introduciendo la cánula desde el orificio vulvar hasta el útero), porque la vagina de la perra es un órgano largo y estrecho que en la parte craneal, entre el cérvix y el vestíbulo tiene un fondo de saco que se extiende hacia adelante en dirección del cuello^{20, 25} y es muy complicado introducir la cánula desde el orificio vulvar hasta el cuerpo del útero sin recurrir a un método quirúrgico, además está reportado por Tsutsui que el medio de recolección que se introduce con este método no es recuperado en proporciones similares y por lo tanto el índice de recolección de embriones es menor¹². En una perra se intentó hacer la recolección con la técnica de Foley a través de una laparotomía, sin embargo el diámetro estrecho de los cuernos uterinos y la hipertrofia del endometrio uterino dificultaron la infusión del medio de lavado.

Se ha intentado recolectar embriones por perfusión de los oviductos y los resultados indican que la recuperación de los embriones es notablemente menor. Esto se debe a que la región de transición entre ellos y el útero es estrecho en la perra y consecuentemente la fuerza que se produce sobre la pared de oviducto al introducir el medio de lavado provoca un reflujo del líquido perfundido, además la hipertrofia del endometrio uterino dificulta la infusión del medio de lavado; esta técnica dificulta la recolección embrionaria^{2, 12}. La recolección de embriones después de realizar la salpingectomía, es significativamente más alta (97.1%), que

por el método de perfusión (42.5%)¹².

Debido a que en el estudio la finalidad no fue implementar una nueva técnica de recolección de embriones, se decidió hacer la ovariectomía y después la recolección, en menos tiempo, con el lavado del aparato reproductor seccionado, evitando así el reflujo del medio de lavado y la pérdida de los embriones.

8.4. ETAPA DE DESARROLLO

Los embriones en una misma perra pueden estar en la misma etapa de desarrollo, pero en algunas se recolectaron cigotos y embriones de 8 células¹². De manera similar, en este estudio, en una de las cuatro donadoras se recuperaron embriones en diversos estadios, desde 2 células hasta blástulas. A diferencia de otras especies no necesariamente deben considerarse como embriones no transferibles por diferencias en el desarrollo⁹, debido a que la ovulación en la perra se extiende por varios días¹³. En las otras 3 perras donadoras se pudo apreciar que el grado de desarrollo de los embriones fue menos variable ya que todos fueron blástulas.

(Ver cuadro 1)

El estado de desarrollo de los embriones obtenidos con relación al pico de LH (día 0) de la primera ovulación es: ovocito primario en el día 2, cigoto 4° día, embrión de 2 células al 5° día, 4 células al 6° día, 8 células al 7°, 16 células al 8°, mórula temprana al 9° día y pasa al útero como blástula al 11° ó 12° día.

Como ya se mencionó anteriormente el pico de LH y el periodo de ovulación en perras puede estimarse por los niveles de progesterona en sangre periférica²³. Basados en el pico de LH (día 0) y asignando hasta 4 d para la ovulación, maduración y fertilización del ovocito, se puede calcular que son necesarias 24 h para cada estado de desarrollo del embrión y al noveno día se espera obtener mórulas y después del día 10 u 11 blástulas^{24,8}. Este método indirecto nos permite calcular los días aproximados que han transcurrido para el desarrollo embrionario. Sin embargo en perras inducidas parece no coincidir porque encontramos embriones de 2, 4 y 8 células a los 17 d después del pico de LH en la perra número 5, pero en las perras número 6 y 10 la etapa de desarrollo de los embriones coincide en que 12 y 13 d después del pico de LH en el útero se pueden hallar blástulas. (Ver cuadro 3 - 6) La diferencia entre una blástula temprana y una blástula madura es un adelgazamiento de la zona pelúcida e incremento de tamaño en la blástula madura.

Resulta difícil diferenciar, en algunas blástulas recolectadas 12 d después de la ovulación, si son eclosionadas o están en proceso de degeneración porque algunas blástulas pueden quedar rodeadas por la zona pelúcida tan tarde como el día 19. Se considera que cuando el embrión se desarrolla a blástula eclosionada, puede ser difícil mantenerlo integro, por lo tanto, se recomienda la recolección de

embriones del conducto intrauterino en un estrecho periodo dentro de los 9 a 11 d después de la ovulación, a pesar de que otros investigadores consideren que el lavado de embriones intactos puede llevarse a cabo tan tarde como el día 18 o 19 después de iniciado el estro ⁴⁰.

8.5. TRANSFERENCIA

En este estudio los embriones fueron transferidos en un solo cuerno uterino con la ayuda del laparoscopio. A la par del presente estudio, Tsutsui *et al.* publicaron los resultados de una investigación, la cual consistió en depositar los embriones en un solo lado del útero y confirmó que son capaces de desarrollarse en ambos cuernos uterinos y que la transferencia unilateral también permite la transferencia embrionaria intrauterina y el desarrollo hasta el final de la gestación ².

Se transfirieron embriones en estados de desarrollo temprano, considerando estudios recientes que indican la capacidad que tienen para desarrollarse hasta el final de la gestación. La transferencia de embriones en los primeros estados de desarrollo (8 células) dentro del útero de las perras no es un factor que influya negativamente sobre el éxito en la gestación ¹².

8.6. GESTACIÓN

Existen ya evidencias de que la gestación por transferencia de embriones es posible, sin embargo dichos estudios únicamente han sido realizados con hembras que presentan celos naturales y nunca en perras inducidas con hormonas ^{2, 7, 11, 12}.

Desgraciadamente en la perra algunos procesos reproductivos aún no se han dilucidado y es difícil con reproducción asistida, lograr una gestación exitosa manejando la información con que disponemos en la actualidad.

Uno de los eventos más notables que influyen sobre la gestación, fue el reducido periodo de liberación de progesterona y los niveles insuficientes para soportar la preñez, relacionados muy probablemente con el deficiente desarrollo y la duración del tejido lúteo formado como respuesta al tratamiento. Se pudo detectar en 2 de 3 perras receptoras, que los niveles de progesterona descendieron dramáticamente y que tuvieron una función lútea inadecuada. En otros estudios también han sido reportadas fases lúteas cortas después de inducir la luteinización con eCG y hCG o ambas, aunque se desconocen las razones específicas de este suceso el tratamiento con un progestágeno activo oral no fue efectivo para mantener la gestación ^{2, 60, 72}. Por lo tanto es un problema más que debemos superar.

Hasta la actualidad se ha confirmado que el éxito en la preñez es posible con una diferencia en de la ovulación de 1 a 2 d entre perra donadora y receptora, lo cual está soportado por hallazgos de un estudio de Tsutsui (en impresión) ¹².

En cualquier proceso de transferencia de embriones se puede considerar la posibilidad de que algunos embriones no se desarrollaron porque murieron durante el proceso de recolección y transferencia. La muerte de algunos embriones, en las perras receptoras, causada por el daño durante la recolección y la transferencia es probable.

9. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede decir que el protocolo utilizado para inducir al estro permitió coleccionar embriones en 30% de las 13 perras que se utilizaron como donadoras, con una producción de 22 embriones. Sin embargo el desarrollo deficiente de los cuerpos lúteos de las perras receptoras inducidas al ciclo es un aspecto que interviene definitivamente en el éxito de la la gestación. Por lo tanto se propone transferir a perras con ciclo natural y realizar más investigaciones enfocadas a los procesos específicos que intervienen en el desarrollo folicular basal y terminal.

10. LITERATURA CITADA

1. Betteridge K J. An historical look at embryo transfer. J Reprod Fert 1981; 62: 1 - 13.
2. Tsutsui T, Hori T, Okasaki H, Tanaka A, Shiono M, Yokosuka M, *et al.* Transfer of canine embryos at various developmental stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing. J Vet Med Sci 2001; 63 (4): 401 - 405.
3. Farstad W. Assisted reproductive technology in canid species. Theriogenology 2000; 53:175 - 186.
4. Esquivel L C, Rivera R J, Páramo R R, López I G, Mata C F, Utilización de la citología vaginal exfoliativa para el seguimiento del ciclo estral del lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*). Memorias del Primer Simposium Nacional sobre el Lobo Gris Mexicano; 1993 agosto 1 – 6; México, D.F.: INE, DDF y UNAM FES - Cuahutitlan.
5. Concannon P W. Induction of fertile oestrus in anoestrus dog by constant infusion of GnRH agonist. J Reprod Fert Suppl 1989; 39 : 149 - 160.
6. Garza M V. Control farmacológico del ciclo reproductivo de la perra. 2º Encuentro Internacional de zootecnia en perros gatos y otras mascotas. Acapulco, Gro. 1998; 135 - 146.
7. Tsutsui T, Shimada K, Nishi M, Kubo N, Murao I, *et al.* An experimental trial on embryo transfer in the dog. Jap J Vet Sci 1989; 51: 797 - 800.
8. Tsutsui T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. J Reprod Fert 1989; Suppl.39: 269 - 275.
9. Noriega S R, Martínez B S, Flores R C. Técnicas de procesamiento de embriones para la transferencia en bovinos. Universidad Nacional Autónoma de México, SUA. 1995; 67 pp.
10. García A J. Resultados de la técnica de congelación y descongelación de embriones en un solo paso. VIII Curso Internacional de Reproducción Bovina. México D.F. 2000; 151 - 154.
11. Kinney G M, Pennycook J W, Schriver M D, Templeton J.W, Kramer D C. Surgical collection and transfer of canine embryos. Biol Reprod. 1979; 20: suppl 1: 96 Abst.

12. Tsutsui T, Hori T, Kawakami E. Intratubal transplantation of early canine embryos. *J Reprod Fert* 2001; 57: 309 - 314.
13. Feldman E C, Nelson R W. Reproducción de la perra. 2nd ed. México: McGraw-Hill Interamericana. 2000; 572 - 803.
14. Olson P N, Nett T M, Bowen R A, Sawyer H R, Niswender G D. Endocrine regulation of the corpus luteum of the bitch as a potential target for altering fertility. *J Reprod Fert* 1989; Suppl 39: 27 - 40.
15. Durrant B S, Pratt N C, Russ K D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Teriogenology*. 1998; 49: 917 – 932.
16. Rivera R J, Esquivel L C, Páramo R R, Vazquez C G. Utilización de la citología vaginal exfoliativa para el seguimiento del ciclo estral del lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*). Reproducción en caninos. Universidad Nacional Autónoma de México. FMVZ. 1998
17. Archbald L F, Baker B A, Clooney L L, Godke R A. A Surgical method for collecting canine embryos after induction of estrus and ovulation with exogenous gonadotropins. *Vet Med Small Anim Clin*. 1980; 75: 228 - 238.
18. Instituto Nacional de Ecología. Proyecto de recuperación del lobo mexicano (*Canis lupus Baileyi*). México D.F. SEMARNAP, 2000.
19. Cué M L. Crioprotección y congelación rápida en nitrógeno líquido de embriones de rata de laboratorio. (Tesis de Licenciatura). México (D.F.) . Universidad Nacional Autónoma de México, FMVZ. 1985.
20. Sisson S, Grossman R G. Anatomía de los animales domésticos. 5ª ed, Barcelona: Salvat, 1982.
21. Ruiz J P. Obtención y maduración de ovocitos de perra. (Tesis de Licenciatura). México (D.F.) Universidad Nacional Autónoma de México, FMVZ. 1995
22. Monniaux D, Huet C, Besnard N, Clément F, Bosc M, Pisselet C, Monget P, Mariana J C. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J Reprod Fert*. 1997; Suppl. 51: 3 - 23.
23. Esquivel L C, Páramo R R, Inseminación artificial en caninos. Universidad Nacional Autónoma de México.

24. Renton J P, Boyd JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJA, Mullaney J, Perry B. Ovulation, fertilization and embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *J Reprod Fert* 1991; 93: 221 - 231.
25. Esquivel L C, Páramo R R. Novedades en la reproducción canina. 2° Encuentro Internacional de Zootecnia en perros, gatos y otras mascotas. Acapulco (Guerrero) Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 1998: 130 – 134.
26. Concannon P W. *Reproduction in domestic animals*, 4 th edition, San Diego California: Perry T Cupps. 1991; 517-534.
27. Concannon P W. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *J Reprod Fert* 1993; Suppl 47: 3 - 27.
28. Concannon P W, McCann J P, Temple M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J Reprod Fert* 1989; Suppl. 39: 3 - 25.
29. Van Haften B, Bevers M M, Van den Brom W E, Okkens A C, Van Sluijs F J, Willemse A H. Increasing sensitivity of the pituitary to GnRH from early to late anoestrus in the beagle bitch. *J Reprod Fert* 1994; 101: 221 - 225.
30. Jeffcoate I A. Endocrinology of anoestrous bitches. *J Reprod Fert* 1993; Suppl 47: 69 - 76.
31. Shille V M, Thatcher M L, Miller D D, Seyfert D F, Sherrod J D. Gonadotrophic control of follicular development and the use of exogenous gonadotrophins for induction of oestrus and ovulation in the bitch. *J Reprod Fert* 1989; Suppl 39: 103 - 113.
32. Hewitt D A, England G C. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *J Reprod Fert* 1997; 51: 83 - 91.
33. Chakraborty P K, Fletcher W S. Serum hormone concentration and their relationships to sexual behaviour at the first and second estrous cycle of the labrador bitch. *Biol Reprod* 1980; 22: 227 - 232
34. Olson P N, Bowen R, Behrendt M, Olson J, Nett T. Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anoestrus, proestrus and oestrus. *Biol Reprod* 1982; 27: 1196 - 1206.

35. Hase M, Hori T, Kawakami E, Tsutsui T. Plasma LH progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. J Vet Med Sci 2000; 62 (3): 243 - 248.
36. Canine, Theriogenology Notes (Female) LMS 531, 1996. Richard Fayrer-Hosken <http://iam.vet.uga.edu>
37. Mc Donald L E. Endocrinología Veterinaria y Reproducción 4ª edición Edit. Interamericana. México, D.F. 1991.
38. Esquivel L C. Ciclo estral de la perra y determinación de sus etapas a través de la citología vaginal exfoliativa. Memorias. Reproducción en caninos. FMVZ. UNAM. 2000.
39. Hoffmann B, Schneider S. Secretion and release of luteinizing hormone during the luteal phase of the oestrus cycle in the dog. J Reprod Fert 1993; Suppl. 47: 85 - 91.
40. Concannon P, Tsutsui T, Shille V. Embryo development hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. J Reprod Fert Supplement. 2001; Suppl. 57: 169 - 179.
41. Jöchle W, Arbeiter K, Post K, Ballabio R, D'Ver A S. Effects on pseudopregnancy, pregnancy and interoestrous intervals of pharmacological suppression of prolactin secretion in female dogs and cats. J Reprod Fert 1989; Suppl 39: 199 - 207.
42. McDougall K, Hay M A, Godrowe K L, Gartley C J, King W A. Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches. J Reprod Fert 1997; 51: 25 - 31.
43. Senger P L. Pathways to pregnancy and parturition. The follicular phase of the estrous cycle. 1st ed. Washington. Current Conceptions, inc.1999: 130 - 146.
44. Bearden J H, Fuaquay W J. Applied Animal Reproduction. 3ª edition. Prentice Hall: New Jersey. 1992.
45. Yamada S, Shimazu Y, Kawaji H, Nakazawa M, Naito K, Toyoda Y. Maturation, fertilization and development of dog oocytes *in vitro*. Biol Reprod 1992; 46: 853 - 858.
46. Bysted B V, Dieleman S J, Hyttel P, Greve T. Embrionic developmental stages in relation to the LH peak in dog. J Reprod Fert 2001; Suppl 57: 181 - 186.

47. Linde C, Karlsson I. J. The correlation between the cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch. *Small Anim Pract* 1984; 25: 77 - 82.
48. Jeffcoate I A, Lindsay F E . Ovulation and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *J Reprod Fert* 1989; suppl 39: 277 - 287
49. Beverly J, Purswell, Dact N A., Department of Large Animal Clinical Sciences Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine Virginia Tech Blacksburg, VA 24061 September, Veterinary Medicine 2000 www.hilltopanimalhospital.com
50. Arnold S, Arnold P, Concannon P W, Weilenmanns R, Hubler M, Casal M *et al.* Effect of duration of PMSG treatment on induction of oestrus, pregnancy rates and the complications of hiper-oestrogenism in dog. *J Reprod Fert* 1989; Suppl 39: 115 - 122.
51. Cain J L, Lasley B L, Cain G R, Feldman E C, Stabenfeldt G H. Induction of ovulation in bitches with pulsatile or continuous infusion of GnRH. *J Reprod Fert Suppl*, 1989; 39: 143 - 147
52. Kooistra H S, Okkens A C, Bevers M M, Van Haften B, Dieleman S J, Schoemaker J. Concurrent pulsatile secretion of Luteinizing Hormone and Follicle Stimulating Hormone during different phases of the estrous cycle and anestrus in beagle bitches. *Biol Reprod*, 1999; 60, 65 - 71.
53. Santoro N, Filicori M, Crowley W F. Hipogonadotropic disorders in men and women: diagnosis and therapy with pulsatile gonadotropin releasing hormone. *Endocrine Rev.* , 1986; 7: 11 - 23.
54. Silvia P J, Squires E L, Nett T M. Pituitary responsiveness of mares challenged with GnRH at various stages of the transition into the breeding season. *J of Anim Sci* 1987; 64: 790 - 796.
55. Caillol M, Meunier M. Effect of ovariectomy at two periods of the year on LH and FSH basal concentrations and pituitary response to LHRH in the brown hare (*Lepus europaeus*). *J Reprod Fert* 1990; 88: 533 - 542.
56. Concannon P, Lasley B, Vanderlip S. LH release, induction of oestrus and fertile ovulation in response to pulsatile administration of GnRH to anoestrous dogs. *J Reprod Fert* 1997; Suppl. 51: 41 - 54.
57. Cain J L, Lasley B L, Cain G R, Feldman E C, Stabenfeldt G H., Use of pulsatile intravenous administration of gonadotropin - releasing hormone to induce fertile estrus in bitches. *Am J Vet Res* 1988; 49 (11): 1993 - 1996

58. Vanderlip S L, Wing A E, Felt P, Linkie D, River J, Concannon P W. *et al.* Ovulation induction in anoestrous bitches by pulsatile administration of gonadotropin - releasing hormone. *Lab Anim Sci* 1987; Aug 37 (4): 459 - 464.
59. Concannon P W. LH release, induction of oestrus and fertile ovulations in response to pulsatile administration of GnRH to anoestrous dog. *J Reprod Fert* 1997; Suppl 51 : 41 - 54.
60. Bley M A, Simon J C, Estevez A G, Jiménez de A I, Baranao J N. Effect of follicle-stimulating hormone on insulin-like growth factor 1 stimulated rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* 1992; 131: 1223 - 1229.
61. Roy S K, Harris S G. Antisense epidermal growth factor oligodeoxynucleotides inhibit follicle stimulating hormone induced in vitro DNA and progesterone synthesis in hamster preantral follicles. 1994; 8: 1175 - 1181.
62. Fortune J E. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod.* 1994; 50: 225 - 232
63. Richards J S. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews.* 1994; 15: 725 - 751
64. Verstegen J, Onclin Ksilva L, Concannon P. Termination of obligate anoestrus and induction of fertile ovarian cycles in dog by administration of purified pig LH. *J Reprod Fert* 1997; 111: 35 - 40
65. Scorgie N J. The treatment of sterility in the bitch by use of gonadotrophic hormones. *Vet Rec* 1939; 51: 265 - 268.
66. Sokolowsky J H, Medernach R W, Helper L C, Exogenous hormone therapy to control the estrous in the bitch. *J Am Vet Med Assoc* 1968; 153: 425 - 428.
67. Wright P J. A study of the response of ovaries of bitches to pregnant mare serum gonadotrophin (PMS) and human chorionic gonadotrophin (HCG) *Proc. 7th Int Congr Anim Reprod And A. I. . Munich 3, 1972; 1075 - 1079.*
68. Thun R, Watson P, Jackson G L Induction of estrus and ovulation in the bitch using exogenous gonadotropins *Am J Vet Res* 1977; 38: 483 - 486.
69. Wright P J. The induction of oestrus and ovulation in the bitch using pregnant mare serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin. *Aust Vet J* 1980; 56: 137 - 140.

70. Renton J P, Munro C D, Heathcote R H Some aspects of the etiology, diagnosis and treatment of infertility in the bitch. *J Reprod Fert* 1981; 61: 289 - 296.
71. Allen W E. Attempted oestrus induction in four bitches using pregnant mare serum gonadotrophin. *J Small Anim Pract* 1982; 28: 223 - 231.
72. England G C W, Allen W E. Repeatability of events during spontaneous and gonadotrophin-induced oestrus in bitches. *J Reprod Fert* 1991; 93: 443 - 448.
73. Bardens J W. Hormonal therapy for ovarian and testicular dysfunction in the dog. *J Am Vet Med Assoc* 1970; 159: 1405 - 1410.
74. Paisley L G, Fahning M L. Effects of exogenous follicle stimulating hormone in bitches. *J Am Vet Med Assoc* 1977; 171: 181 - 185.
75. Barta M, Archibald L F, Godke R A. Luteal function of induced corpora lutea in the bitch. *J Reprod Fert* 1982; 18: 541549
76. Chakraborty P K, Wildt D E, Seager S W J. Induction of estrus and ovulation in the cat and dog. *Vet Clin North Am* 1982; 12: 85 - 92.
77. Shille V M, Thatcher M J, Simons K J. Efforts to induce estrus in the bitch using pituitary gonadotropins. *J Am Vet Med Assoc* 1984; 184: 1469 - 1473.
78. Prabhakar S, Sharma R D, Dhaliwal G S. Efficacy of hormonal and non-hormonal drugs for induction of oestrus in anoestrus bitches. *Indian Vet J* 1990; 67: 443 - 435.
79. Okkens A C, Kooistra H S, Dieleman S J, Bevers M M. Dopamine agonistic effects as opposed to prolactin concentrations in plasma as the influencing factor on the duration of anoestrus in bitches. *J Reprod Fert* 1997; Suppl. 51: 55 - 58
80. Kooistra H S, Okkens A C, Bevers M M, Popp-Snijders C, Van Haften B, Dieleman S J, Schoemaker J. Bromocriptine-induced premature oestrus associated with changes in the pulsatile secretion pattern of follicle-stimulating hormone in beagle bitches. *J Reprod Fert* 1999; (117): 387 - 393.
81. Zoldag L, Fekete S, Casaky I, Bersenyi A. *Theriogenology* 2001; 55 (8): 1657 - 1666.
82. Jeukenne P, Verstegen J. Terminación of dioestrus and induction of oestrus in dioestrus non pregnant bitches by the prolactin antagonist cabergoline. *J Reprod Fert* 1997; Suppl. 51: 59 - 66.

83. Caballero G V, Fertilidad de embriones frescos y congelados transferidos por laparoscopia en cabras. (Tesis de licenciatura). México, (D.F.) Universidad Nacional Autónoma de México, FMVZ. México, 1995.
84. Carballada C C. Sincronización del estro, inducción de multiovulación y recolección de embriones en perras fuera de su ciclo estral normal en el trópico. (Tesis de licenciatura). Veracruz, (Veracruz) México. Universidad Veracruzana, 1982.
85. Concannon P W, De Gregario G B. Canine Vaginal Cytology. Small Animal Reproduction and Fertility. In Burke T. ed., 1986: 96 - 111.
86. Archbald, F L, Baker A B, Clooney L L, Godke A R. A surgical method for collecting canine embryos after induction of estrus and ovulation with exogenous gonadotropins. Vet Med Small Anim. Clin. 1980; 228 - 238.
87. Concannon P W, Hansel W, McEntee K. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch Biol Reprod 1977; 17: 604 - 615.
88. Bouchard G F, Solorzano N, Concannon P W, Youngquist R S, Bierschwal C J. Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology and ELISA for progesterone. Theriogenology. 1991; 35: 603 - 611.
89. Bodinand F, Fontbonne A, Maurel M C, Siliart B. Fertilization time in the bitch in relation to plasma concentration of oestradiol, progesterone and luteinizing hormone and vaginal smears. J Reprod Fert 1993; 47: 63 - 67.
90. Wright P J. Application of vaginal cytology and plasma progesterone determinations to the management of reproduction in the bitch. J. Small Anim Pract. 1990; 31: 335 - 340.
91. Renton J P, Boyd J S, Harvey M J, Ferguson J M, Nickson D A, Eckersall P D. Comparison of endocrine changes and ultrasound as means of identifying ovulation in the bitch. Res Vet Sci 1992; 53: 74 - 79.
92. Silva L D M, Onclin K, Verstegen J P. Assessment of ovarian changes around ovulation in bitches by ultrasonography, laparoscopy and hormonal assays. Vet Radiol Ultrasound 1996; 37: 313 - 320.

11. ANEXOS

Cuadro 1: Eventos reproductivos de la perra.

EVENTO REPRODUCTIVO CANINO	DIAS DESPUÉS DEL PICO DE LH	DIAS DESPUÉS DE LA MONTA FÉRTIL
Inicio del proestro	-25 a -3	
Inicio del comportamiento de estro	-4 a +6	
Pico de estradio	-3 a -1	
Disminución del edema vaginal	-2 a 0	
Oleada de LH	-1 a 0	
Pico de LH	0	-9 a +3
Primera monta fértil	-3 a +9	0
Inicio de la formación de células superficiales	-1 a +1	
Pico de células superficiales de la vagina	-2 a +6	
Ovulación del ovocito primario	2	-7 a +5
Ovocito en el oviducto		
Reanudación de meiosis	3	
Salida del primer cuerpo polar	4	-4 a +7
Penetración espermática	2 a 9	0 a 7
Fertilización y formación del pronúcleo	4 a 9	0 a 7
Perdida de óvulos sin fertilizar	6 a 9	
Embrión de dos células	6 a 10	1 a 12
Disminución de las células superficiales	6 a 10	0 a 9
Reduce la cronificación vaginal	6 a 11	1 a 9
Leucocitos en frotis vaginal	5 a 13	
Mórula en oviducto	8 a 10	
Blastocito dentro del útero	9 a 11	3 a 14
Migración intracornual (blastocito de 1mm)	10 a 13	
Migración transcornual	12 a 15	
Implantación	17 a 19	9 a 22
Diagnóstico radiográfico de la preñez	45 a 48	38 a 50
Parto	64 a 66	57 a 69

Adaptado de Concannon *et al.* ²⁸

CUADROS Y GRÁFICAS

Cuadro 1: Relación del desarrollo embrionario con la fecha de recolección contada a partir del primer día de inseminación.

Perra No.	Día de Recolección (después de la monta)	No. Embriones recolectados	Estado Desarrollo										
			2	4	8	16	mt	mm	Bt	bm	be	bc	
5	14	8	2	2	1						2		1
6	14	5								3		2	
10	12	5										1	4
9	12	4											4

2, 4, 8, 16 = no. de células en el embrión, mt = mórula temprana, mm = mórula madura, bt = blástula temprana, bm = blástula madura, be = blástula expandida, bc = blástula en eclosión

Cuadro 2 : Relación que tuvo el diagnóstico del estro con los niveles de progesterona y citología vaginal.

Relación del diagnostico citológico con progesterona	No. perras	porcentaje
Coinciden	7	39%
primero p4 alcanzó niveles ovulatorios (2 d antes)	3	17%
previo al incremento de p4 se presentó la queratinización (1 - 4d después)	6	33%
no tuvieron niveles ovulatorios de P4 pero si signos de estro	2	11%

Cuadros comparativos del comportamiento hormonal en relación con la citología en las perras donadoras

Cuadro 3: La recolección fue 14 d después de la primera inseminación, pero el periodo fértil según los niveles de progesterona lo inició un día antes.

Fecha	31	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Perra 5	pico LH	5.03	ovulación	ins 6.18			12.58		16.18		19.38			6.95		3.79		recolección

Cuadro 4: La recolección en la perra no. 6 fue el día 10 después de que inició el periodo fértil

Fecha	31	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Perra 6				ins 0.0		pico LH	2.26	ovulación	2.20		1.56			7.29		11.13		recolección

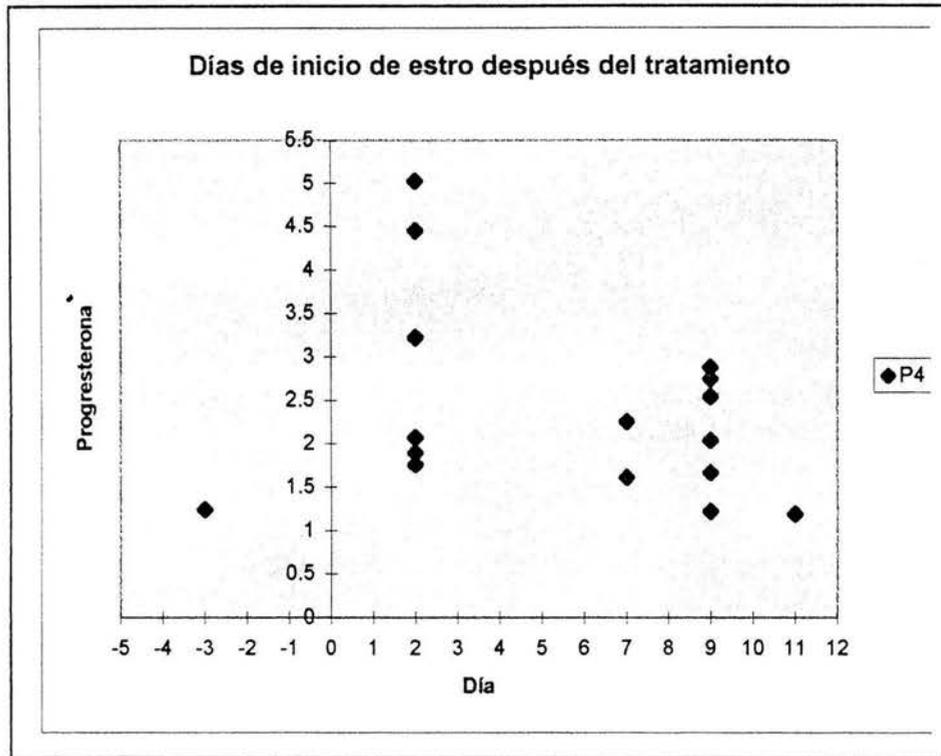
Cuadro 5: En este caso la recolección después de la inseminación fue a los 11 d, pero contados a partir del periodo fértil fueron 5 d.

Fecha	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Perra 9,	0.30		ins 0.35			0.38	pico LH	2.75	ovula ción	0.02				recol ecció n

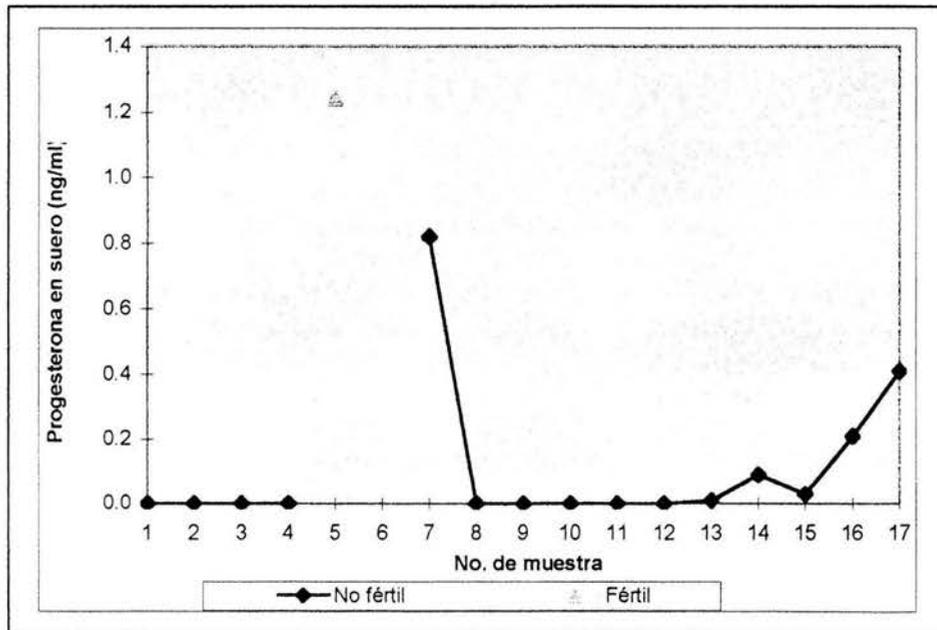
Cuadro 6: El momento de recolección con base en la citología vaginal se realizó 12 d después de la inseminación y en este caso coincidió con el inicio del periodo fértil de progesterona.

Fecha	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Perra 10	pico 2.07		ins 3.31			8.94		11.67		14.68				recol ecció n

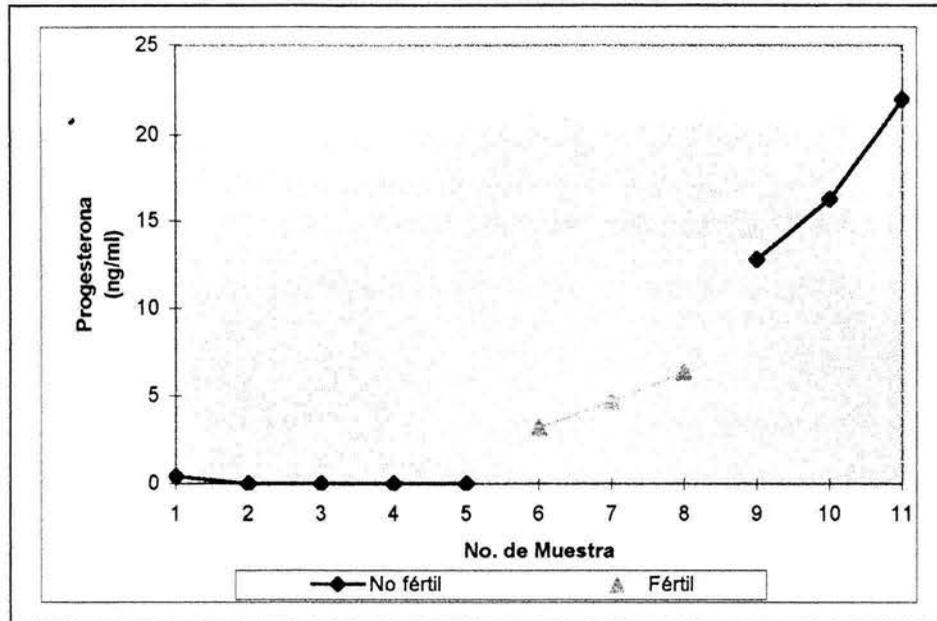
Estro según la citología
primera inseminación
Pico preovulatorio de LH
Inicio del periodo fértil
Recolección de embriones



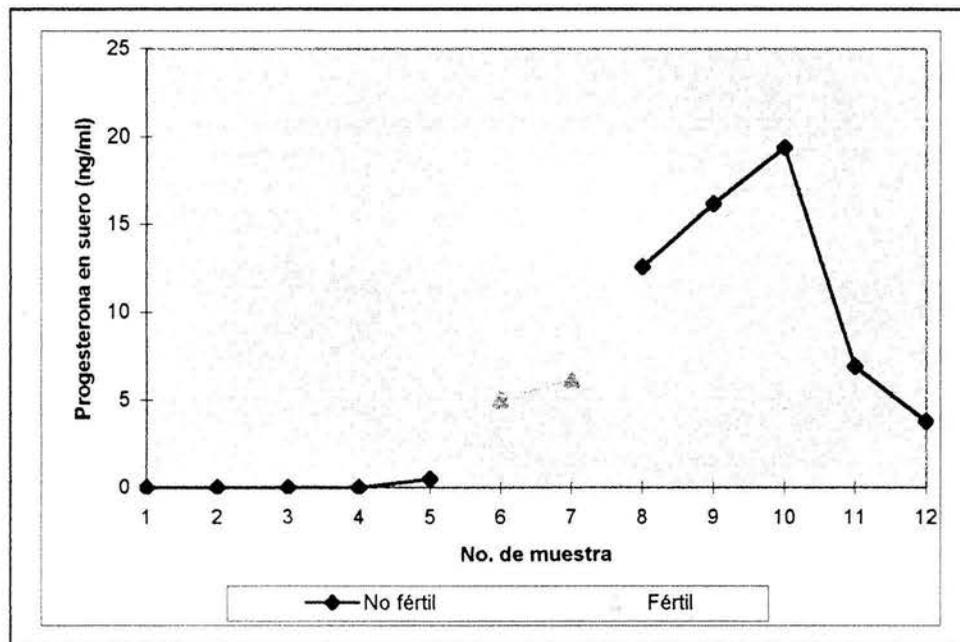
Gráfica 1. Tiempo transcurrido desde el día de inicio del tratamiento hasta el momento en que sucedieron los primeros cambios en los niveles de progesterona. (Los valores -5 a -1 indican los 5 días de tratamiento hormonal)



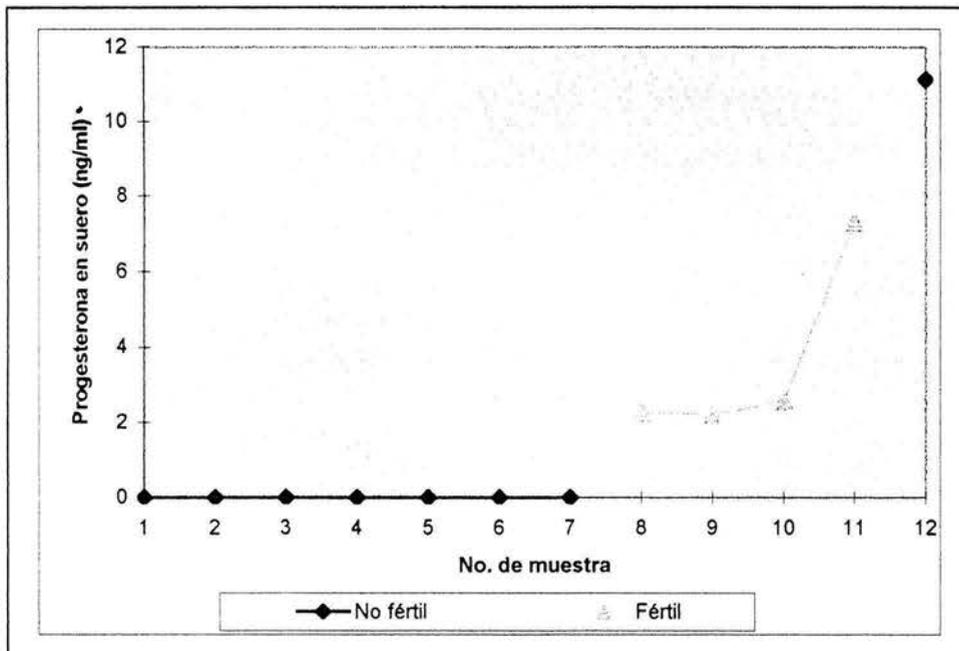
Gráfica 2. Niveles hormonales de progesterona en la receptora No. 1



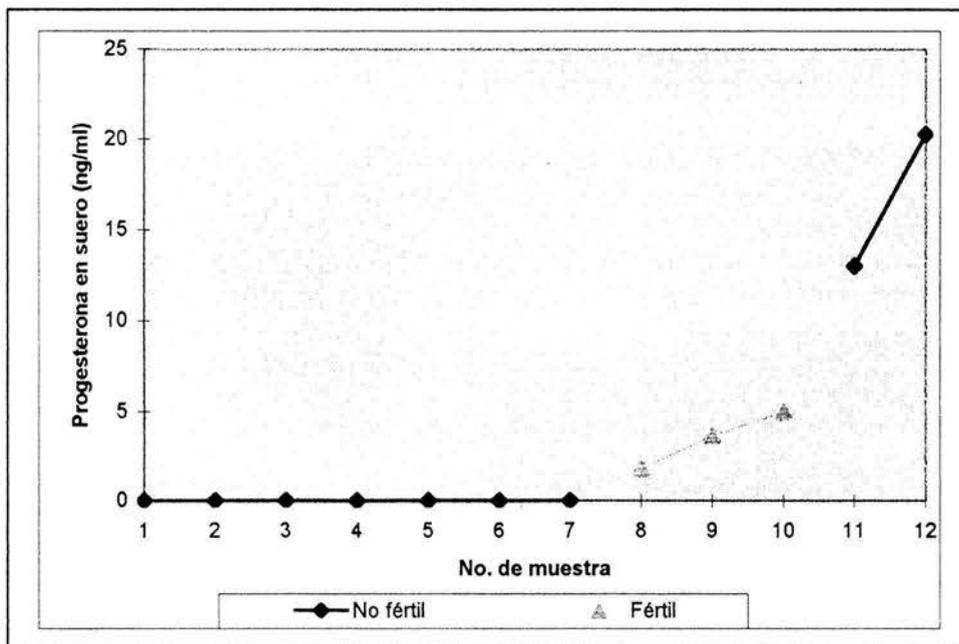
Gráfica 3. Niveles hormonales de progesterona en la donadora No. 2



Gráfica 4. Niveles hormonales de progesterona en donadora 5

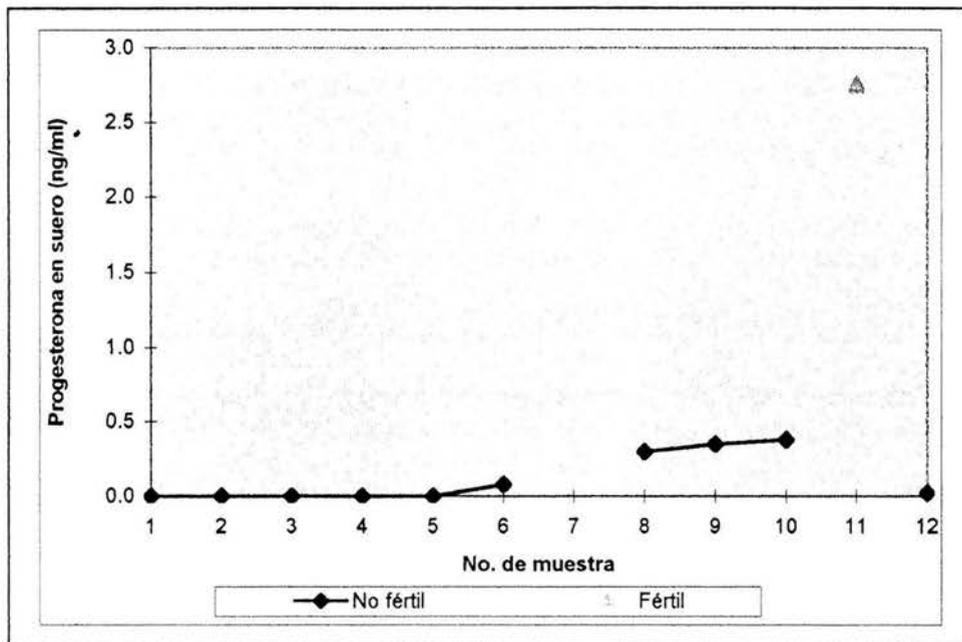


Gráfica 5. Niveles hormonales de progesterona en la donadora 6

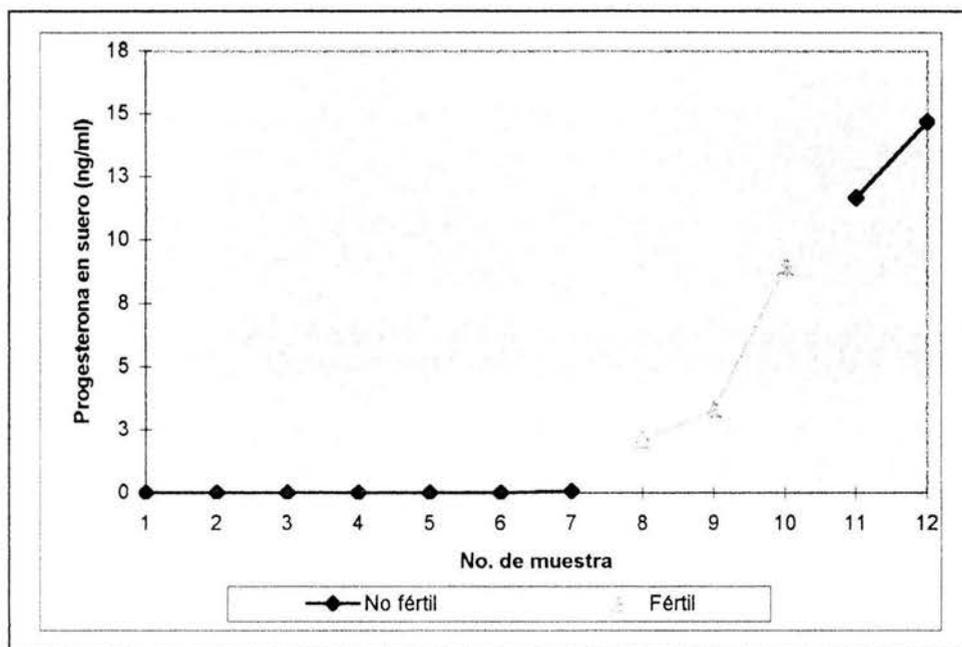


Gráfica 6. Niveles hormonales de progesterona en la donadora No. 8

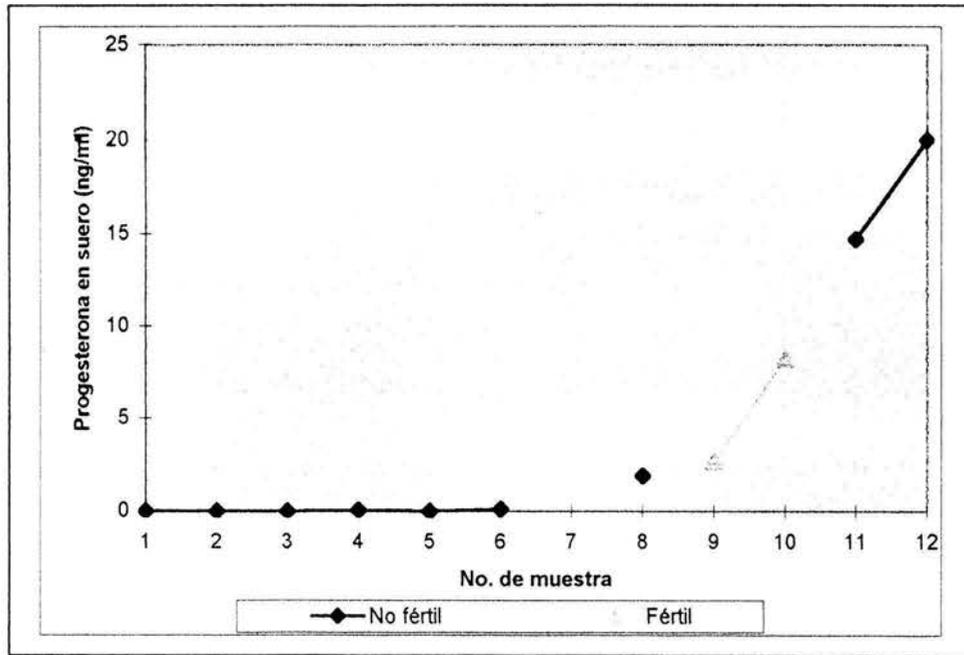
ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



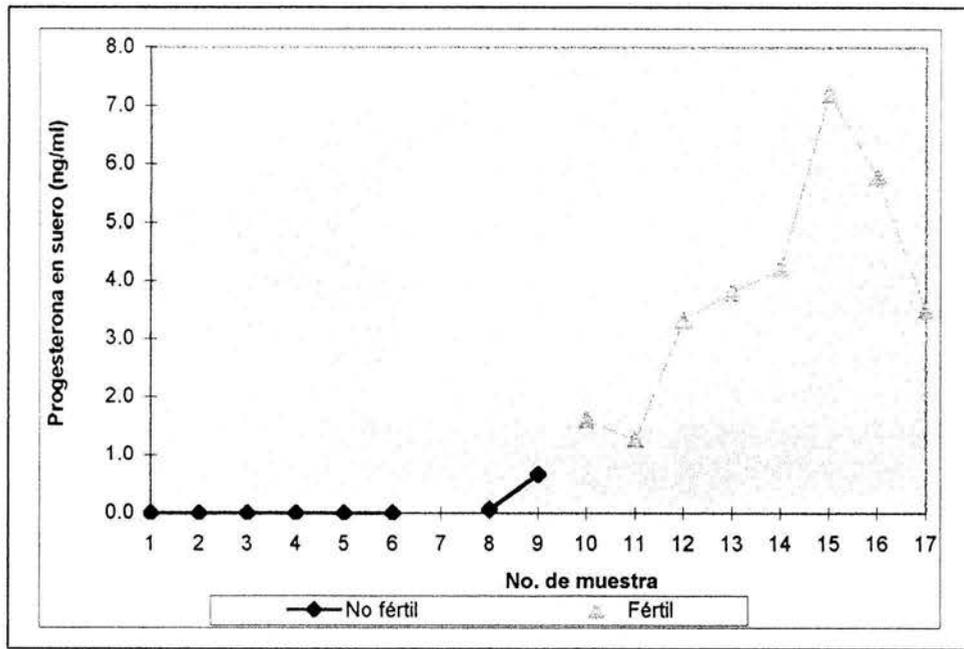
Gráfica 7. Niveles hormonales de progesterona en la donadora No. 9



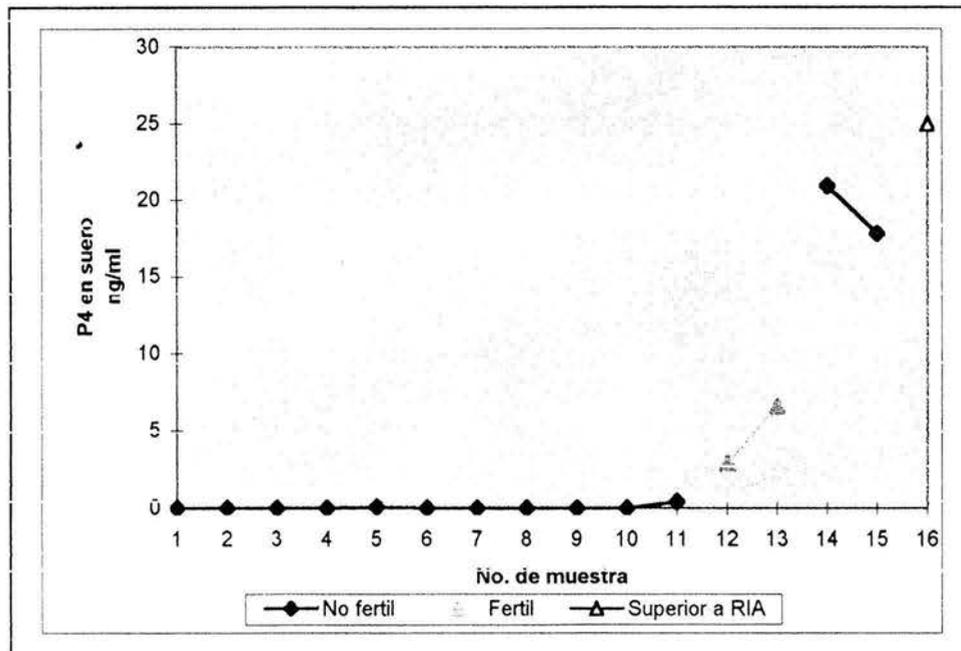
Gráfica 8. Niveles hormonales de progesterona en la donadora No. 10



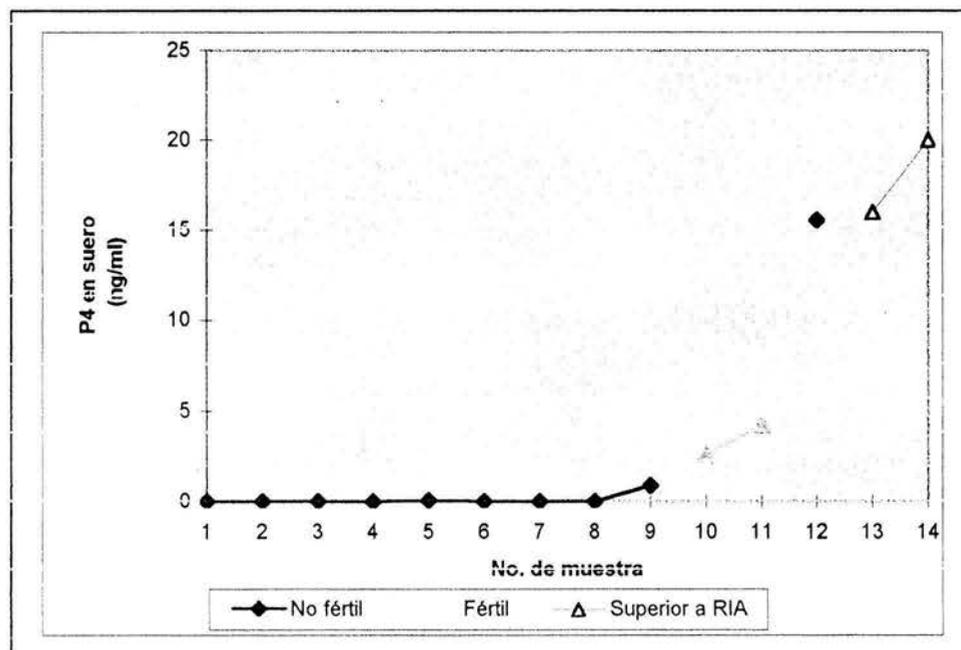
Gráfica 9. Niveles hormonales de progesterona en la receptora No. 11



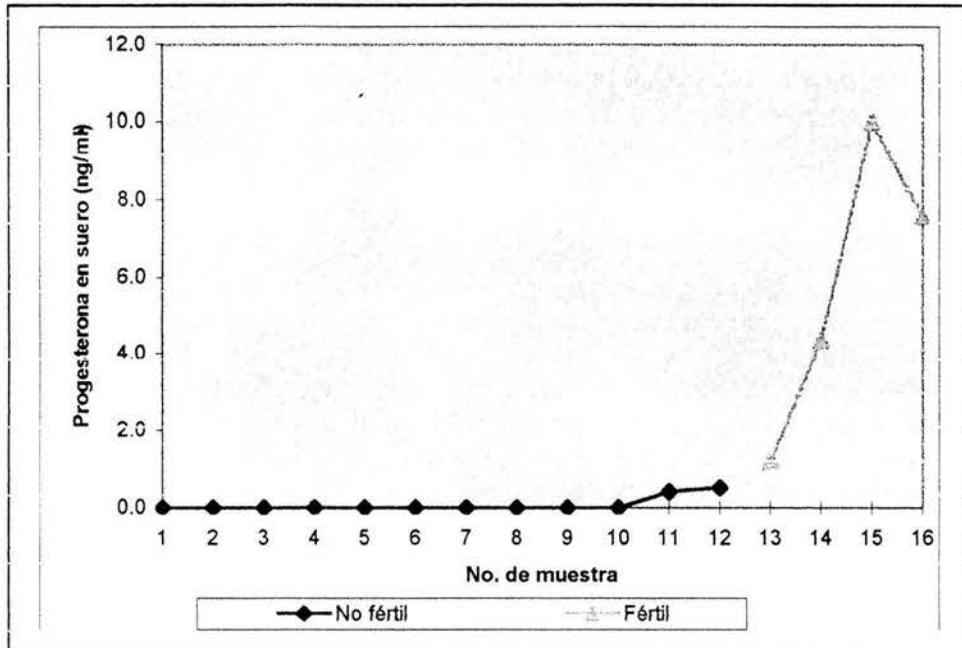
Gráfica 10. Niveles hormonales de progesterona en la receptora No. 12



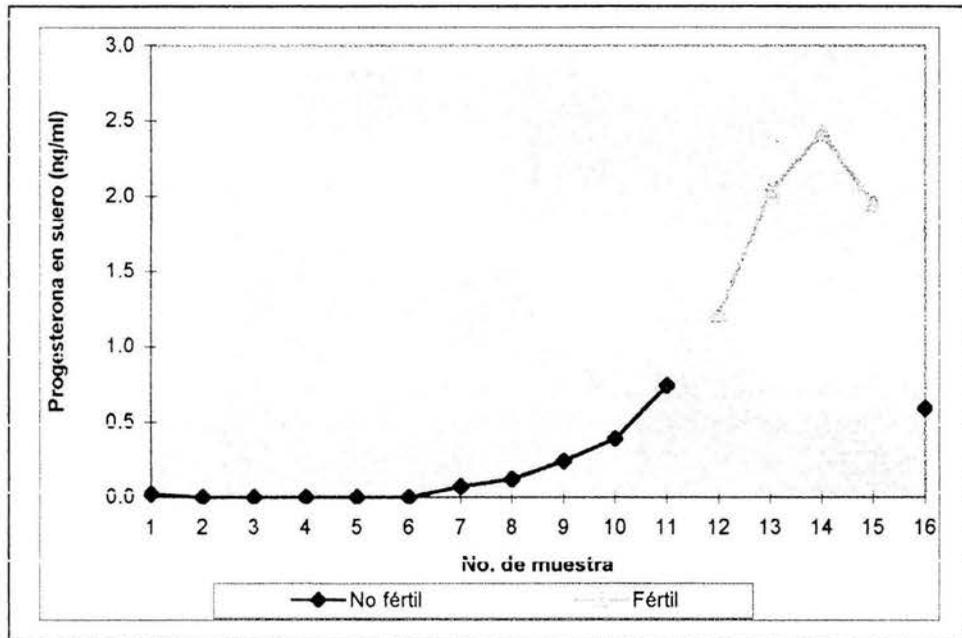
Gráfica 11. Niveles hormonales de progesterona en la donadora No. 13 (Los valores superiores no fueron registrados en RIA por exceder los niveles medibles).



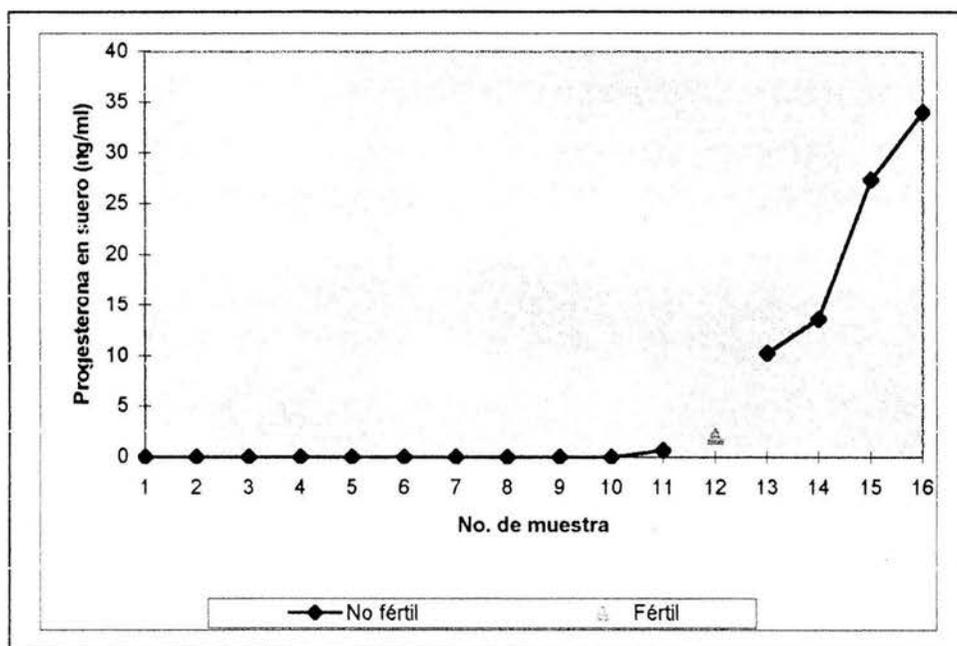
Gráfica 12. Niveles hormonales de progesterona en la donadora No. 14 (Los valores superiores no pudieron medirse en RIA por exceder los niveles medibles)



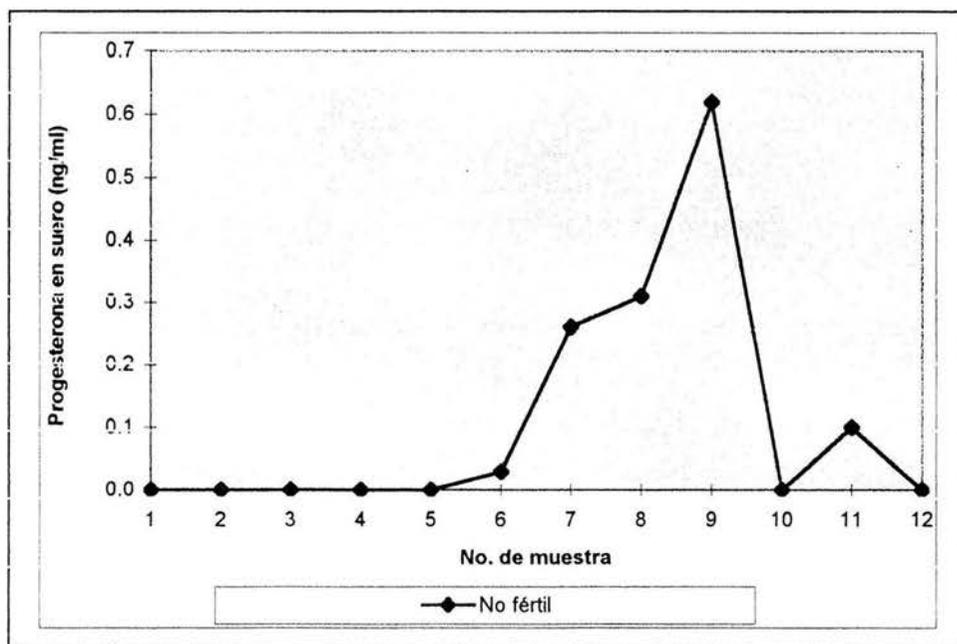
Gráfica 13. Niveles hormonales de progesterona en la donadora No. 15



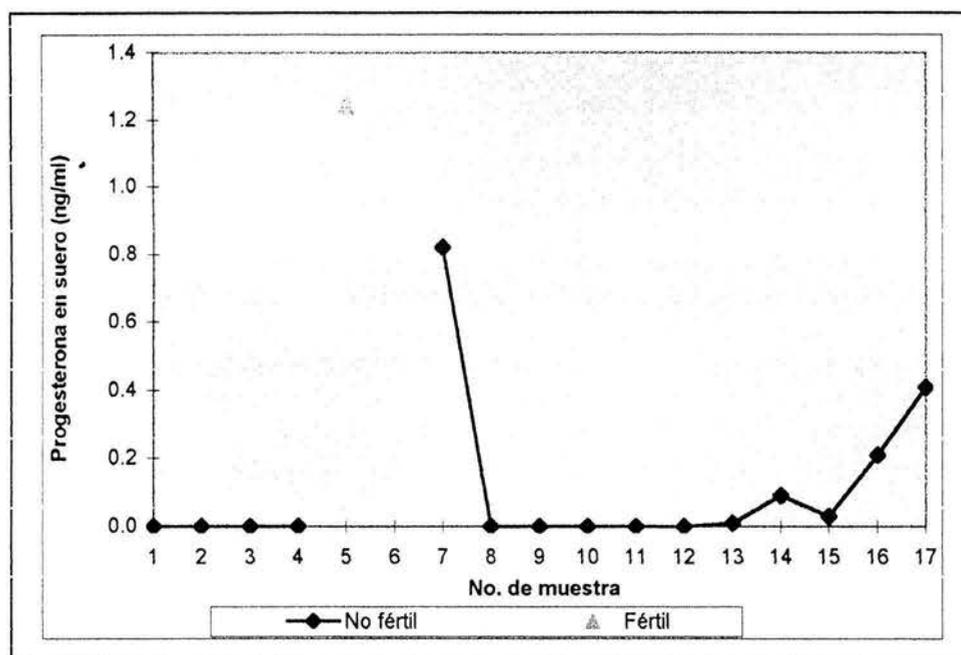
Gráfica 14. Niveles hormonales de progesterona en la receptora No. 16



Gráfica 15. Niveles hormonales de progesterona en la receptora No. 17



Gráfica 16. Niveles hormonales de progesterona en la donadora No. 4



Gráfica 17. Niveles hormonales de progesterona en la donadora No. 18