

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE CIENCIA ANIMAL

**INDUCCIÓN DE ESTRO Y OVULACIÓN EN PERRAS (*Canis lupus familiaris*)
MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE EXTRACTO HIPOFISIARIO EQUINO (HAP).
DESCRIPCIÓN CITOLÓGICA Y CLÍNICA.**

Memoria de Título presentada como parte de
los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO

ELSA ANDREA MANSILLA GALLARDO

VALDIVIA – CHILE

2008

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Renato Gatica

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Dra. María Angélica Hidalgo

Firma

Dr. Julio Thibaut

Firma

FECHA DE APROBACIÓN:

31 de Diciembre de 2008

A mis queridos padres por su
esfuerzo y apoyo incondicional.

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
5. RESULTADOS.....	15
6. DISCUSIÓN.....	20
7. BIBLIOGRAFÍA.....	23
8. ANEXOS.....	26
9 AGRADecIMIENTOS.....	30

1. RESUMEN

El presente estudio fue realizado con el propósito de evaluar la efectividad del Extracto Hipofisiario Equino (HAP) en la inducción de estro y ovulación en perras.

Para este propósito se seleccionaron 6 perras mestizas adultas en estado de anestro, el cual fue determinado mediante examen clínico, reproductivo y citología vaginal. A las perras seleccionadas se les administró durante 10 días consecutivos, una dosis diaria de 10 mg de Extracto Hipofisiario Equino (HAP), vía subcutánea, suspendido en 1,5 ml de suero fisiológico estéril. El día 11 o cuando se observó un 100% de células superficiales en el frotis, se les aplicó una dosis única de 1000 UI de Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG) vía intramuscular para estimular la ovulación. Se realizaron frotis vaginales todos los días a cada una de las perras a fin de determinar los cambios citológicos que ocurrieron en ellas para evidenciar las diferentes etapas del ciclo reproductivo. Se observaron y registraron en una ficha individual los cambios clínicos y conductuales que se presentaron en los animales a medida que progresaba el tratamiento. Entre los 7 y 10 días después de la administración de hCG, las perras fueron sometidas a una ovariectomía. Se determinó el peso y volumen de cada ovario y finalmente se evaluó el número de folículos y cuerpos lúteos presentes en ellos.

Los resultados obtenidos fueron: el inicio del proestro se presentó en promedio a los $5,3 \pm 1,4$ días con un 45 % de células superficiales. El estro fue a los $11,5 \pm 1,8$ días con un 95 % de células superficiales. En relación a los ovarios, el volumen y peso promedio de ambos ovarios fue de $5,1 \pm 2,6$ cm³ y $4,5 \pm 3,3$ g respectivamente. El número total de folículos y cuerpos lúteos fue de $7 \pm 1,8$ y $14 \pm 4,5$ respectivamente.

Debido a que el 100% de las perras en estudio respondió al tratamiento utilizado, se concluye que es posible inducir estro y ovulación en perras, en base a la utilización de Extracto Hipofisiario Equino (HAP) y Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG).

Palabras claves: inducción, estro, perra, canino, Extracto Hipofisiario equino (HAP).

2. SUMMARY

INDUCTION OF ESTRUS AND OVULATION IN BITCHES (*Canis lupus familiaris*) THROUGH THE USE OF HORSE ANTERIOR PITUITARY EXTRACT (HAP). CLINIC AND CITOLOGIC DESCRIPTION .

The aim of this study was to assess the effect of horse anterior pituitary extract (HAP) in the induction of estrus and ovulation in bitches.

For this purpose 6 adult hybrid anoestrus bitches were used. Anoestrus was determined by clinical and reproductive examinations and vaginal cytology. The selected bitches were administered for 10 consecutive days, with a daily dose of 10 mg of horse anterior pituitary extract (HAP) SC, suspended in 1.5 ml of sterile saline solution. At day 11, or when a 100% superficial cells in the smear were observed, a single dose of 1.000 IU of human chorionic gonadotropin (hCG) IM was applied to stimulate ovulation. Vaginal smears were taken every day to each bitch to determine the cytological changes. Clinical and behavioral changes was recorded in animals during treatment. 7 to 10 days after hCG administration, the bitches were ovariohysterectomized. Weight and volume of each ovary were determined and the number of follicles and corpora lutea present in the ovaries was recorded.

The beginning of proestrus, was on average 5.3 ± 1.4 days with 45% of superficial cells. The onset of estrus was 11.5 ± 1.8 days with 95% superficial cells. The volume and weight of both ovaries was $5,1 \pm 2.6 \text{ cm}^3$ and $4,5 \pm 3.3 \text{ g}$ respectively. The total number of follicles and corpora lutea was $7 \pm 1, 8$ and $14 \pm 4,5$ respectively.

As 100% of the dogs in the study responded to the treatment used. It can be concluded that it is possible to induce estrus and ovulation in bitches, based on the use of Horse Anterior Pituitary Extract (HAP) with a daily dose of 10 mg, and Human Chorionic Gonadotropin (hCG).

Keywords: Induction, estrus, bitch, canine, Horse Anterior Pituitary Extract (HAP).

3. INTRODUCCIÓN

3.1 CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE LA PERRA

La perra doméstica (*Canis lupus familiaris*), ha desarrollado una fisiología reproductiva que la diferencia de otras especies domésticas, como también de las especies caninas salvajes. Posee prolongados períodos interestrales, siendo indiferente a la estación del año y al largo del día. La luteinización y la producción de progesterona comienzan antes de la ovulación, y la fase copulatoria continúa a pesar del alza de progesterona sanguínea (Feldman y Nelson 2000).

La perra es considerada una hembra monoéstrica típica y su actividad reproductiva no presenta patrones estacionales definidos, presentando así celos durante todo el año (Concannon y Temple 1989). Existen antecedentes que indican que factores sociales tales como la presencia de una perra en celo puede inducir el estro en otras perras, mientras que factores estresantes pueden suprimir la actividad sexual (Sánchez 1998).

Desde el punto de vista práctico, se considera que un animal ha alcanzado la pubertad cuando es capaz de liberar gametos y de manifestar secuencias completas de comportamiento sexual. La pubertad es básicamente el resultado de un ajuste gradual entre la actividad gonadotrófica creciente y la capacidad de las gónadas de asumir simultáneamente la estereoidogénesis y la gametogénesis (Hafez 2000).

En la perra la pubertad se alcanza 2 a 3 meses antes de haber alcanzado el peso adulto. Así, algunas razas pequeñas exhibirán su primer celo entre los 6 y 10 meses de edad. Las razas grandes sin embrago, pueden no comenzar a ciclar hasta los 12 a 24 meses. El inicio de la pubertad depende de varios factores entre ellos: genéticos, ambientales, nutricionales y sanitarios (Feldman y Nelson 1991).

La pubertad no es sinónimo de madurez sexual, este último término se refiere a la edad reproductiva óptima y se adquiere a partir del segundo o tercer ciclo estral (celo). En la perra el máximo rendimiento reproductivo se mantiene hasta los 6 años aproximadamente, momento a partir del cual la fertilidad comienza paulatinamente a disminuir (Pineda 1991).

3.1.1 Ciclo estral de la perra:

La perra es considerada monoéstrica no estacional ya que sólo tiene un celo por estación reproductiva. El intervalo interestral es muy variable entre razas y entre hembras de una misma raza, y es probable que esté influenciado por condiciones ambientales e interacciones sociales (Pineda 1991).

El ciclo estral de la perra se puede dividir en cuatro fases: un período de inactividad

sexual denominado anestro, de duración variable (promedio: 120 días), le sigue el proestro, de duración promedio 9 días, que se caracteriza por la presencia de edema vulvar y descarga sanguinolenta. El estro, o período durante el cual la hembra aceptará al macho, es la tercera fase, la ovulación se produce de forma espontánea al comienzo de esta etapa del ciclo, la cual dura en promedio 9 días. Si no tiene lugar la gestación, el estro va seguido del diestro, que dura en promedio 65 días, el cual acaba de forma imperceptible en el anestro (Jeffcoate 1999).

3.1.1.1 Proestro: Corresponde al inicio de un nuevo ciclo reproductivo. El comienzo del proestro se define como el momento en que la perra inicia el sangramiento a través de la vulva. Este fenómeno no es evidenciable en todas las perras, especialmente en aquellas de razas de pelo largo o en aquellas que se lamen frecuentemente su zona genital. El proestro tiene una duración promedio de 9 días, con un rango de 6 a 21 (De los Reyes y Sánchez 2000).

Esta etapa se caracteriza por un predominio estrogénico. Estos estrógenos son sintetizados a partir de los folículos ováricos en desarrollo, los que inician su crecimiento en la etapa previa al proestro, es decir, antes de terminar el anestro (Concannon 1998). Al comenzar el proestro, los estrógenos se encuentran en aumento provocando un efecto de retroalimentación negativa a nivel hipotálamo-hipofisiario para FSH, la cual disminuye notoriamente en esta etapa y, por otra parte, el alza de estrógenos desencadena la retroalimentación positiva para la LH (Parvizi 2000). El aumento de los estrógenos continúa hasta alcanzar su máximo 1 a 2 días antes del pico de LH, que generalmente ocurre hacia el fin del proestro. La progesterona, en cambio, se encuentra en niveles bajos (menos de 0,5 ng/ml) aumentando 2 a 3 días antes del fin del proestro (Badianand y col 1993). Este aumento de progesterona hacia fines del proestro, estaría relacionado a una luteinización de los folículos preovulatorios (Concannon 1998).

El aumento de los estrógenos estimula una serie de cambios, dentro de los cuales cabe destacar: edema vulvar, vaginal y uterino producto de un aumento en la retención de electrolitos y sodio. Cambios conductuales como inquietud, excitabilidad, polidipsia, y disminución del apetito. Descarga vulvar de secreción sanguinolenta que proviene del útero debido al aumento de la vascularización endometrial. Alargamiento de los cuernos uterinos y proliferación del epitelio vaginal con manifiesta producción de células superficiales (Sánchez 1998). En el momento del pico de LH hay un cambio en el estrógeno sérico desde muy altas concentraciones a concentraciones progresivamente bajas, combinadas con el ascenso concomitante de las concentraciones de progesterona. Con este cambio hormonal hay una reducción en el edema del tracto reproductivo con la consecuencia del ablandamiento distintivo de la vulva (England y Concannon 2002)

Las hembras se vuelven atractivas para los machos durante el proestro debido a las feromonas liberadas en las secreciones vaginales y la orina. A pesar de eso, la hembra durante el proestro no aceptará al macho para el apareamiento (Pineda 1991).

Citológicamente el proestro se caracteriza por la presencia de neutrófilos, abundantes eritrocitos, células intermedias grandes y pequeñas y escasas células superficiales. Hacia el final del proestro disminuye considerablemente el número de neutrófilos, debido a que éstos

ya no son capaces de atravesar la pared vaginal. Además se presenta un predominio de células intermedias y superficiales (Gobello y Corrada 2001).

3.1.1.2 Estro: El estro o celo, comienza el primer día en que la hembra acepta la monta y cópula y termina cuando deja de aceptar al macho. La duración de este período es de 9 días en promedio, con un rango que va de 4 a 21 días (Concannon 1998).

La perra en estro busca activamente al macho. Al momento del apareamiento adopta una posición definida, tensa los miembros posteriores, desvía y mantiene la cola sobre un lado y expone la vulva al arquear el lomo (Pineda 1991). Clínicamente se puede apreciar reflejo de desviación de la cola y una disminución de la turgencia de la vulva la cual, se hace más blanda y flácida. La mucosa vaginal está pálida con pliegues muy acentuados y secreción serosanguinolenta de color tenue (Sánchez 1998).

El estro se inicia con el alza preovulatoria de LH que tiene una duración aproximada de 24 a 72 horas. Hay un alza de FSH, que ocurre 1 a 2 días luego del aumento de LH (Concannon 1998). El incremento de la progesterona, que ha subido de sus niveles basales, previo al alza de LH, continúa aún después del pico de LH, teniendo un rápido aumento los siguientes 10 días. Un efecto de esta alza de progesterona, es aumentar y prolongar la intensidad de la conducta estral (Concannon y Temple 1989).

La ovulación en la perra es espontánea, no inducida por el coito y se produce 24 a 72 horas después del pico de LH, siendo en la mayoría de los casos 48 horas después. La cantidad de ovocitos liberados es variable dependiendo de la raza, con rangos entre 5 y 15 por periodo ovulatorio (Tsutsui 1989). En la perra los ovocitos liberados se encuentran en estado de ovocito primario, es decir con su núcleo en estado de vesícula germinativa, en la profase de la primera división meiótica y no como ovocitos secundarios como en otras especies. La meiosis se reinicia un día después de la ovulación, generalmente en la porción media del oviducto La maduración ovocitaria, implica que el gameto finalice la primera división meiótica e inicie la segunda, quedando detenido en la segunda metafase de la meiosis. Sólo después de la maduración, el ovocito está apto para ser fecundado. Este proceso de maduración se alcanza generalmente alrededor del tercer día post ovulación (Farstad 2000).

El número de ovocitos presentes en los ovarios de una perra recién nacida se estiman en 700.000. Para la pubertad disminuyen a 250.000; a los 5 años 30.000 y a los 10 años sólo unos cuantos cientos. La fecundidad comienza a declinar en forma progresiva una vez que la perra cumple 6 años de edad o más (Feldman y Nelson 1991).

Durante el celo, la citología vaginal permanece relativamente constante. No existen modificaciones que sugieran el día del pico de LH o de ovulación. Las células superficiales y escamas nucleares representan más del 80% de las células vaginales totales y a menudo suelen alcanzar el 100% (Feldman y Nelson 1991).

Un frotis vaginal obtenido durante el estro no contiene neutrófilos y disminuye considerablemente la cantidad de glóbulos rojos. Si bien puede observarse en el fondo del

frotis escasas bacterias, la respuesta leucocitaria está ausente. El fondo del frotis de una perra en estro es limpio y libre de detritus celulares (Gobello y Corrada 2001).

3.1.1.3 Diestro: Este periodo se define como la fase de predominio de la progesterona y es la etapa del ciclo en la cual los cuerpos lúteos son completamente funcionales. La etapa de diestro en la perra es similar al largo de la gestación, aproximadamente 63 días, siendo levemente más largo en hembras no preñadas. El comienzo de esta etapa está dado por el primer día en que la perra rechaza la monta. En la mayoría de las perras el diestro comienza 8 a 10 días después del pico de LH (Badianand y col 1993).

El aumento de progesterona continua hasta aproximadamente 2 días después de iniciado el diestro, alcanzando sus valores máximos entre los días 20 a 30 después de la ovulación, comenzando un descenso gradual por alrededor de 5 a 6 semanas (Concannon 1998).

La progesterona induce cambios a nivel endometrial y miometrial, favoreciendo el ambiente para la implantación y disminuyendo las contracciones uterinas. En el útero hay hipertrofia glandular e hipervascularización. En el oviducto se alargan las fimbrias y se protruye la bursa ovárica. La mucosa vaginal se presenta rosado-pálido con pliegues poco notorios (Sánchez 1998).

Los niveles de prolactina se mantienen con ligeras variaciones a través de esta etapa, esta hormona hipofisiaria juega un rol importante en la mantención del cuerpo lúteo, especialmente hacia mediados del diestro, aumentando los receptores para LH en las células luteínicas (Fernández y col 1987). En una hembra gestante, la prolactina tiende a aumentar lentamente, cuando la progesterona comienza a disminuir, el pico de prolactina se observa uno a dos días antes del parto (Galac y col 2000). En perras no gestantes, también hay un aumento en la secreción de prolactina cuando la progesterona baja sus niveles plasmáticos (De los Reyes y Sánchez 2000).

No se conoce bien en las perras el mecanismo por el cual el cuerpo lúteo regresa, lo que ocurre normalmente hacia el fin del diestro. No obstante, aunque en perras que han sido hipofisectomizadas en diestro, se produce la lisis del cuerpo lúteo, no pareciera ser que el mecanismo fisiológico en la regresión del cuerpo lúteo sea la disminución de LH, ya que las concentraciones de esta gonadotropina tienden a aumentar al final del diestro (Olson y col 1984). Por otra parte, tampoco pareciera ser que la secreción de prostanglandina endometrial, como ocurre en los rumiantes, esté involucrada en la luteolisis, ya que en las perras histerectomizadas no hay un aumento en la duración del cuerpo lúteo (Chaffaux 1993).

En el diestro el número de células superficiales presentes en el frotis disminuye mientras que las células parabasales e intermedias se incrementan marcadamente. Asimismo, en los 7-10 días iniciales del diestro reaparecen los neutrófilos en número variable. Es importante reconocer como normal esta aparición de neutrófilos en los frotis obtenidos en diestro temprano a fin de diferenciarlos de posibles cuadros infecciosos. Puesto que los glóbulos rojos también pueden presentarse en algunos frotis vaginales obtenidos al inicio del

diestro, es muy difícil diferenciar el proestro del diestro basándose exclusivamente en la citología vaginal (Gobello y Corrada 2001).

Finalmente el diestro termina con la lisis del cuerpo lúteo y el descenso de los niveles de progesterona. Luego de esto el útero, que ha estado bajo la influencia de la progesterona por un tiempo prolongado, entra en una fase de regeneración (De los Reyes y Sánchez 2000).

3.1.1.4 Anestro: Esta etapa se extiende desde el fin del diestro hasta el siguiente proestro. El comienzo del anestro en perras que no se preñaron, no es fácil de distinguir a diferencia de las hembras en gestación, donde el parto delimita la fase de diestro de la de anestro (De los Reyes y Sánchez 2000).

El anestro corresponde a la etapa del ciclo estral en la cual no existe actividad reproductiva evidente y se definía como un lapso de inactividad ovárica. Esta definición ya no es sostenible ya que se ha demostrado que los ovarios de la perra están activos y bastante sensibles a la estimulación gonadotrópica endógena, semanas antes del proestro (Pineda 1991). A medida que progresa el anestro, va ocurriendo un aumento en la sensibilidad hipofisiaria a la acción de los factores liberadores producidos en el hipotálamo (GnRH). De esta forma los niveles de FSH que estaban bajos durante el diestro, aumentan para dar inicio una nueva onda de crecimiento folicular (De los Reyes y Sánchez 2000).

Esta etapa, al igual que las otras del ciclo, presenta variación en su duración de acuerdo a características genéticas, edad, estado sanitario y otros factores. Su duración promedio es aproximadamente de 120 días (Concannon 1998).

La citología vaginal del anestro es relativamente constante. Primariamente se observan un predominio de células parabasales y en menor medida células intermedias pequeñas. Si bien pueden hallarse algunos neutrófilos, su número es muy inferior comparado con el principio del diestro. Pueden o no verse bacterias; cuando éstas se presentan usualmente reflejan la flora normal (Feldman y Nelson 1991).

3.2. CITOLOGÍA VAGINAL Y SU UTILIDAD CLÍNICA.

La citología vaginal es una técnica orientadora para la determinación del momento del ciclo estral en la perra, dato no solamente necesario para el asesoramiento del servicio sino también para resolver numerosas situaciones clínicas. La evaluación de las células exfoliadas del tracto genital también puede ayudar al diagnóstico de varios desórdenes genito-uritarios. Los métodos de preparación de los extendidos vaginales son simples y económicos lo que justifica su aplicación (Gobello y Corrada 2001).

La nomenclatura de las células vaginales se basa en la morfología celular. La literatura antigua se refiere a células queratinizadas v/s no queratinizadas y/o cornificadas v/s no cornificadas. La perra sin embargo, no exhibe un epitelio vaginal cornificado, lo que da origen a una nomenclatura diferente que describe las principales alteraciones en las células vaginales

caninas debidas a la influencia estrogénica. Estos diferentes tipos celulares representan diferentes estadios de muerte celular. Cuando las células vaginales redondas normales mueren se vuelven más grandes, de forma más irregular y de tinción más pálida. Estas células contienen núcleos progresivamente más pequeños que se hacen picnóticos antes de la desintegración final, que deja una célula anuclear (Feldman y Nelson 1991).

En los frotis de la mucosa vaginal se distinguen los siguientes tipos de células normales comenzando de la capa vaginal más profunda hacia el lumen vaginal: células parabasales, intermedias, metaestrales y superficiales (Gobello y Corrada 2001).

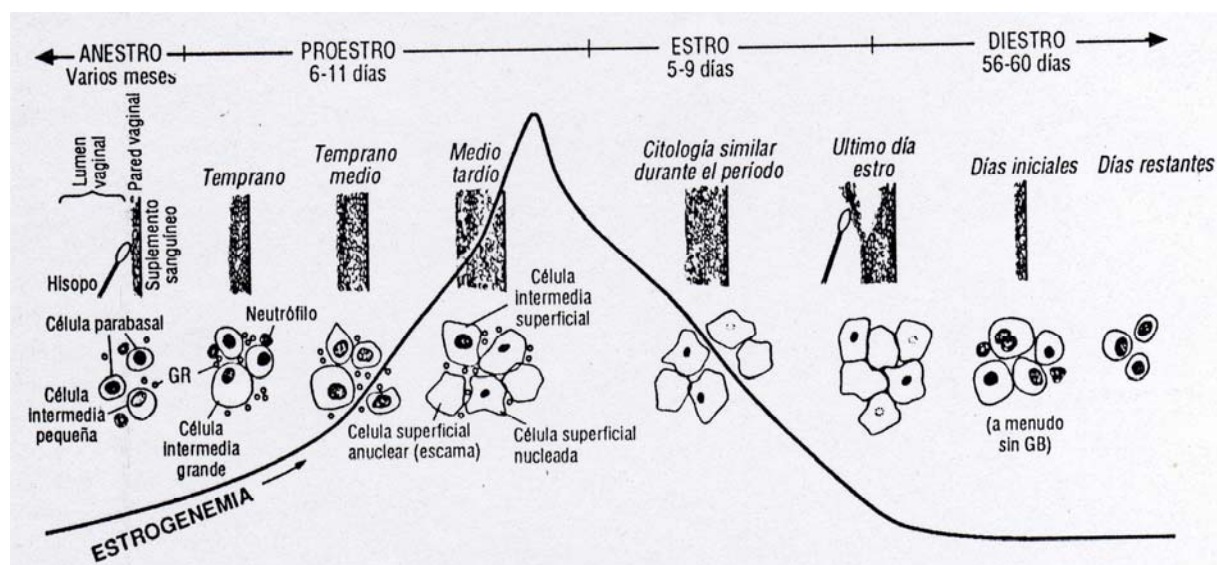


Figura 1. Ilustración de los cambios producidos en el espesor de la pared vaginal, citología vaginal y niveles de estrógenos en una perra promedio que experimenta un ciclo estral (Feldman y Nelson 1991).

Células parabasales: son células vaginales sanas y pequeñas. Son redondas o ligeramente ovales, tienen núcleos redondos grandes y cantidades relativamente pequeñas de citoplasma (Feldman y Nelson 1991).

Células intermedias: varían su tamaño desde apenas más grandes que las parabasales hasta un volumen del doble de tamaño. Estas células tienen márgenes irregulares redondos a ovales lisos y los núcleos suelen ser más pequeños que los encontrados en las células parabasales. Este cambio en la morfología refleja el primer paso en la muerte celular, pues las células se vuelven más grandes y parecen tener cantidades relativamente mayores de citoplasma y núcleos más pequeños (Feldman y Nelson 1991).

Células metaestrales: son células vaginales intermedias grandes que contienen uno o más neutrófilos dentro de su citoplasma. Suelen observarse en el frotis vaginal de una perra en diestro temprano o con vaginitis (Feldman y Nelson 1991).

Células superficiales: son las células más grandes que se observan en los extendidos. Estas células tienen bordes angulosos, planos y agudos y su tinción es exigua. Sus núcleos son pequeños o picnóticos, además presentan una pérdida gradual de la coloración. Dentro de esta clasificación también se encuentran las escamas anucleares que corresponden a células superficiales anucleares, se caracterizan por ser células grandes, irregulares, muertas, que representan el final de un proceso iniciado con las células parabasales redondas (Feldman y Nelson 1991).

La interpretación de la citología vaginal observada en la muestra, se hace de acuerdo al predominio de los distintos tipos celulares, los cuales son orientativos de los diferentes momentos del ciclo estral. No obstante es imprescindible hacer un seguimiento de la evolución del cuadro celular a través del ciclo estral, ya que un preparado aislado podría resultar compatible con distintos momentos del ciclo (Gobello y Corrada 2001).

3.3 INDUCCIÓN DE ESTRO EN PERRAS

Los avances logrados en los últimos años en el conocimiento de la biología reproductiva de la perra doméstica, junto a la disponibilidad de nuevos productos hormonales han permitido mejorar el manejo del ciclo estral de la hembra canina (Stornelli y col 2006).

Debido a las características reproductivas de la perra, el desarrollo de un método efectivo para la inducción de estro predecible en perras sería muy importante, especialmente en el caso de perras de alto valor económico o genético, además resulta esencial para aquellos que se dedican a la crianza, en cuyo caso les permitiría aumentar los nacimientos en épocas del año en que aumenta notablemente la demanda de cachorros (navidad, día del niño, etc.). A su vez podría permitir reducir el número de hembras en los criaderos, por lo cual los costos se reducirían. En adición a lo anterior, la inducción de ciclos estrales es casi una necesidad en aquellas hembras que presentan anestros prolongados y en aquellas que alcanzan tardíamente la pubertad, a quienes se les reduce notablemente la posibilidad de quedar gestantes (Hernández y col 2003).

La inducción de ciclos y la reducción del intervalo interestro en la perra pueden realizarse mediante cuatro alternativas (Concannon y col 1997). La primera incluye la utilización de una combinación de gonadotrofinas (eCG y hCG o hMG), gonadotrofinas de la pituitaria (FSH y LH) o dietilestilbestrol (DES) y FSH. La segunda alternativa incluye la utilización de GnRH y sus agonistas (cistorelina y buserelina) o superagonistas (nafarelina, lutrelina) para estimular la liberación de hormonas gonadotrópicas endógenas de la hipófisis. La tercera alternativa incluye la utilización de prostanglandina para inducir luteolisis y acortar el diestro. La cuarta y última alternativa incluye la supresión del anestro mediante la utilización de los agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, cabergolina, metergolina) que actúan inhibiendo la prolactina y acortando así los periodos interestrales (Stornelli y col 2006).

Las gonadotropinas disponibles comercialmente y utilizadas en perros son la FSH, la gonadotropina coriónica equina (eCG), la LH porcina, la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la gonadotropina menopáusica humana (hMG). Existen tejidos diferentes a la hipófisis que son capaces de producir gonadotropinas, las dos fuentes más importantes de tales hormonas, de interés en medicina veterinaria, son el suero de yegua preñada, del que se obtiene la eCG y la orina de mujer embarazada, de la cual se obtiene la hCG. La eCG tiene una actividad biológica similar a la FSH, siendo utilizada principalmente para inducir desarrollo folicular, y en dosis altas superovulación, en diversas especies (Stornelli y col 2006). Por otra parte la acción biológica de la hCG es semejante a la de la hormona luteinizante, es por esto que se utiliza ampliamente para inducir ovulación, además de agente terapéutico para inducir luteinización y posible ovulación de quistes ováricos en ganado bovino. En la perra se ha estudiado la eficacia de varios protocolos combinados de eCG y hCG habiéndose reportado diferentes resultados (McDonald 1996).

De las gonadotropinas utilizadas en perros, la más ampliamente estudiada para la inducción de estro es eCG, con protocolos de administración que van desde la aplicación de inyecciones diarias a semanales usando la vía intramuscular o subcutánea. Sin embargo se ha descrito falla lútea prematura con el consecuente acortamiento del diestro y pérdida de preñez en algunos protocolos basados en el uso de eCG (Kutzler 2007).

En cuanto a la utilización de GnRH. exógena o agonistas de GnRH, los protocolos descritos incluyen administración endovenosa pulsátil de GnRH, goteo subcutáneo constante de un agonista de GnRH y administración de un agonista vía subcutánea 3 veces al día durante 14 días. El principal inconvenientes de los protocolos antes mencionados es su alto costo y lo impráctico para su uso rutinario. La administración prolongada de GnRH ha reportado sobreestimulación de la hipófisis, supresión de la secreción de LH y disminución de la secreción de progesterona (Kutzler 2005).

El dietilestilbestrol (DES) también se ha usado para la inducción de ciclos estrales. Sin embargo, con el uso de estrógenos siempre se debe considerar la potencial aparición de piometras, neoplasias mamarias y otros problemas genitales (Gobello y Corrada 2001).

3.3.1 Efecto gonadotrófico del Extracto Hipofisiario Equino (HAP)

El extracto hipofisiario equino (HAP), es un producto crudo obtenido de hipófisis equinas provenientes de matadero, tiene efectos gonadotróficos (FSH principalmente y en menor medida LH) con lo que es posible inducir desarrollo folicular y ocasionalmente ovulación (Gatica 1985).

Como no existe un producto comercial de este extracto, solamente se han podido realizar trabajos experimentales, para inducir estro, ovulación y superovulación, en diferentes especies (Godoy 1998).

En el Instituto de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Chile, se han desarrollado diversos estudios con HAP, trabajando así con bovinos (Araya 1995, Silva

1996), ovejas (Moller 1990, Hernández 1991), cabras (Salas 1984) y terneras prepúberes (Sciarresi y col 1984). También se han realizado un par de estudios en perras, teniendo resultados positivos en inducción de celo y ovulación (Godoy 1998, Corti 2003).

3.4. HIPÓTESIS

Es posible inducir celo y ovulación en perras, mediante la administración de Extracto Hipofisiario Equino (HAP) y Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG).

3.5 OBJETIVOS DEL TRABAJO

3.5.1 Objetivo general.

Determinar si la inducción de celo y ovulación, mediante la administración de extracto hipofisiario equino (HAP) y Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG) es factible ser aplicada en esta especie.

3.5.2 Objetivos específicos.

- Evaluar los cambios clínicos y conductuales producidos por la acción de las hormonas administradas.
- Evaluar los cambios citológicos producidos por acción de las hormonas administradas.
- Evaluar la respuesta ovárica producida por la acción de las hormonas administradas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1. Material biológico

Se utilizaron 6 perras adultas mestizas, con un peso que fluctuó entre 8 y 15 kgs con un promedio de 11,7 kgs, con una condición corporal de 2,0 a 3,0 (escala de 1 a 5), provenientes del programa de control de perros vagos del Servicio de Salud Valdivia. Se les realizó un examen clínico-reproductivo para determinar la condición corporal y la normalidad del tracto reproductivo. Las perras se encontraban clínicamente sanas y en estado de anestro, el cual fue determinado por examen clínico, reproductivo y citología vaginal. La edad fue estimada por cronometría dentaria y fluctuó de 1,5 a 3 años, con un promedio de 2,4.

Los animales utilizados fueron mantenidos, en la etapa inicial de este estudio, en dependencias del Instituto de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Chile. Durante todo el estudio los animales fueron alimentados con concentrado comercial Doko[®] de Purina[®] y mantenidos con agua potable *ad libitum*.

4.1.2. Material hormonal

- Extracto Hipofisiario Equino (HAP): elaborado en el Instituto de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Chile, siguiendo el método descrito por Moore y Shelton en 1964 (Anexo 1), con la modificación de usar hipófisis completa. Este extracto fue probado, antes de ser utilizado en perras, en ratones Rockefeller (Anexo 1).
- Gonadotropina Coriónica Humana hCG¹

4.1.3. Material para citología vaginal

- Portaobjetos
- Tómulas
- Guantes
- Alcohol metílico
- Tinción Giemsa
- Microscopio óptico ZEISS
- Lápiz indeleble

² Pacifor 1%[®] Laboratorio Drag Pharma

4.1.4. Material para ovariectomía

- Acepromacina maleato²
- Tiopental sódico³
- Jeringas de diversos calibres
- Mariposas
- Guantes
- Material quirúrgico
- Hoja bisturí
- Sutura no absorbible
- Placa Petri

4.1.4. Material para la evaluación de los ovarios

- Placa Petri
- Pinza y bisturí
- Lupa estereoscópica
- Pesa
- Bureta
- Regla y papel milimetrado.

4.2 MÉTODOS:

4.2.1. Inducción de celo y ovulación

El preparado de HAP, previamente suspendido en 1,5 ml de suero fisiológico estéril, se administró a las hembras en dosis de 10 mg, vía subcutánea diariamente, durante 10 días. El día 11 o cuando se observó un 100% de células superficiales en el frotis, se le aplicó una dosis única de 1000 UI de hCG vía intramuscular para estimular la ovulación.

Se realizaron frotis vaginales todos los días a cada una de las perras a fin de determinar los cambios citológicos que ocurrieron en ellas, por acción de las hormonas administradas. Las muestras fueron rotuladas, teñidas con Giemsa y observadas con microscopio óptico para poder estimar los cambios producidos a nivel citológico y así estimar el momento de inicio del proestro y estro.

Además se observaron y registraron en una ficha individual (Anexo 2) los cambios clínicos y conductuales que se observaron en los animales a medida que progresaba el tratamiento. Tomándose en consideración la edematización, la tumefacción de la vulva y la descarga de secreciones de tipo sero-sanguinolentas para determinar el inicio y la progresión

³ Pentovet 1g.® Laboratorio Richmond

del proestro y el reflejo de inmovilidad, la desviación de la cola y el intento de monta a otras hembras para el estro.

4.2.2. Remoción del tracto reproductivo:

Entre los 7 y 10 días después de la administración de hCG, las hembras fueron sometidas a una ovariectomía bajo anestesia general, para extraer ovarios, oviducto y útero. La anestesia de los pacientes se realizó mediante la inyección intramuscular de Acepromacina al 1% en una dosis de 1mg/kg y Tiopental sódico al 2% en una dosis de 7 mg/kg. La cirugía se realizó en el Pabellón de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Chile, y los tractos fueron transportados hasta el laboratorio del Instituto de Reproducción Animal en placas Petri con suero fisiológico.

4.3.3 Evaluación de los ovarios recuperados.

En el laboratorio se procedió a separar cuidadosamente los ovarios del resto del tracto reproductor. Posteriormente se separó el ovario derecho del izquierdo para proceder a realizar las siguientes mediciones:

En primer lugar se determinó el tamaño de cada uno mediante el uso de una regla y papel milimetrado, registrándose así el ancho y el largo.

Luego se procedió a registrar el peso de cada ovario, mediante el uso de una pesa digital calibrada marca Sartorius. A continuación se procedió a medir el volumen de cada ovario, para esto se procedió a agregar 50 ml de agua en una bureta, volumen que fue registrado como volumen inicial, y posteriormente se agregó el ovario por separado, se procedió a registrar la nueva lectura de la bureta la cual se registró como volumen final. Al volumen final se le restó el volumen inicial para así determinar el desplazamiento del líquido por acción del ovario determinándose así su volumen.

Para concluir, se procedió a registrar el número de folículos y cuerpos lúteos presentes en cada ovario, mediante la observación bajo una lupa estereoscópica.

4.3.- ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Para el análisis de resultados, se utilizó el método descriptivo. Los datos obtenidos fueron ingresados en planillas utilizando el programa Microsoft® Excel®, calculando promedios y desviación estándar.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS PERRAS EN ESTUDIO.

En el cuadro 1 se muestran las características de las perras tratadas. El porcentaje inicial de células superficiales, fue determinado mediante citología vaginal el día anterior al inicio del tratamiento con HAP, y fluctuó de 2 a 10% con un promedio de 6,6%.

Cuadro 1. Edad estimada, peso y porcentaje de células superficiales vaginales inicial de las 6 perras tratadas con 10 mg de HAP.

PERRA N°	EDAD (años)	PESO (kg)	% CÉL. SUP. INICIALES
1	2,5	12	5
2	1,5	8	2
3	2,5	13	10
4	3	11	5
5	2,5	15	10
6	2,5	11	8
X ± D.E.	2,4 ± 0,5	11,7 ± 1,8	6,6 ± 3,2

Cél.: células; Sup.: superficiales; X: promedio; D.E: desviación estándar

5.2 RESPUESTA DE LAS PERRAS AL TRATAMIENTO CON EXTRACTO HIPOFISIARIO (HAP).

En promedio el proestro comenzó a los 5,3 días de iniciado el tratamiento con HAP, esto fue determinado a través de los resultados de la citología vaginal en conjunto con los signos clínicos observados. En relación a la citología, se observó la desaparición de las células parabasales vistas en los frotis iniciales (figura 2A y 2B), predominio de células intermedias, aumento de células superficiales, además de la aparición de otros tipos celulares como eritrocitos y neutrófilos (figura 3A y 3B). En cuanto a los signos clínicos presentes, se destacaron la edematización y tumefacción de la vulva, además de la descarga vulvar de secreciones de tipo sero-sanguinolentas en 5 de las 6 perras tratadas.

El estro, se inició a los 11,5 días de tratamiento, lo cual fue establecido por el predominio de células superficiales en los frotis (Figura 4A y 4B), sobre un 90%, en conjunto con los signos clínicos observados como reducción del edema y la descarga vulvar y aparición de cambios conductuales tales como reflejo de inmovilidad, desviación de la cola al presionar la zona lumbar e intento de monta a otras hembras (Cuadro 2).

Cuadro 2. Promedio y desviación estándar del inicio del proestro y estro, determinados mediante citología vaginal, en las 6 perras tratadas durante 10 días consecutivos con 10 mg de HAP (Día 1: 1° día de tratamiento con HAP).

PERRA	INICIO PROESTRO		INICIO ESTRO		DURACIÓN PROESTRO (días)
	N°	Días	% Cel. Sup.	Días	
1	5	50	9	95	4
2	6	45	12	90	6
3	3	45	10	100	7
4	6	40	14	90	8
5	5	50	11	95	6
6	7	40	13	100	6
X ± D.E.	5,3 ± 1,4	45% ± 4,5	11,5 ± 1,8	95% ± 4,5	6,2 ± 1,3

Cél.: células; Sup.: superficiales; X: promedio; D.E: desviación estándar

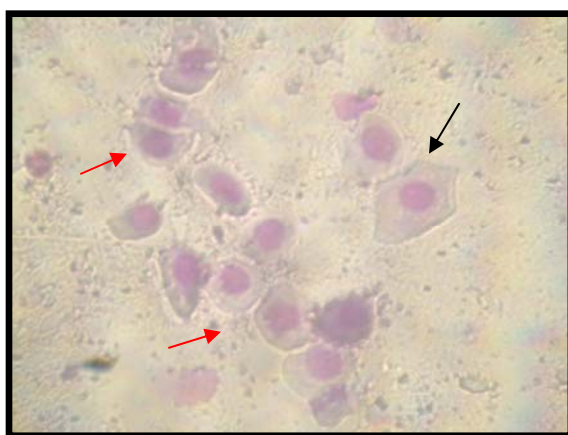


Figura 2A Frotis vaginal de perra en anestro, se observan cúmulos de células parabasales (↑) y una célula intermedia (↑). Tinción Giemsa 400X.



Figura 2B Células parabasales predominantes durante el anestro. Se destaca su núcleo redondo y central rodeado de escaso citoplasma. Tinción Giemsa 400X.

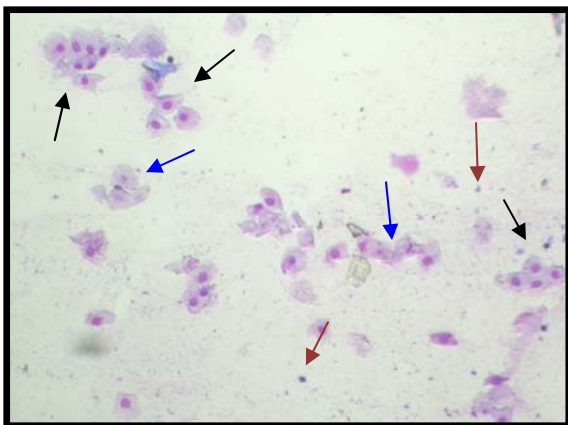


Figura 3A Frotis vaginal de una perra en proestro, se observan principalmente células intermedias (↑), algunas células superficiales (↑) y eritrocitos en el fondo (↑) Tinción Giemsa 100X.

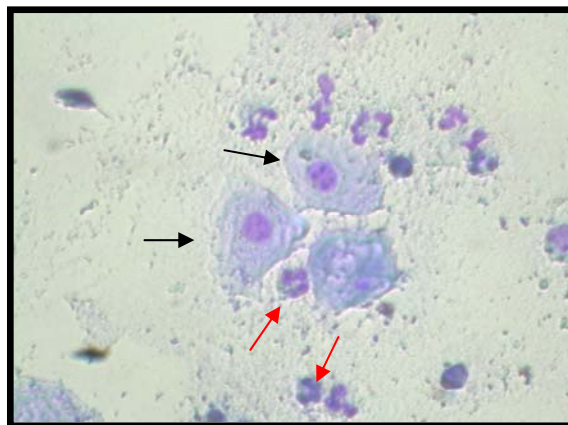


Figura 3B Células intermedias (↑) con bordes irregulares, predominantes durante el proestro. Además se observan algunos neutrófilos (↑) en el frotis. Tinción Giemsa 400X.

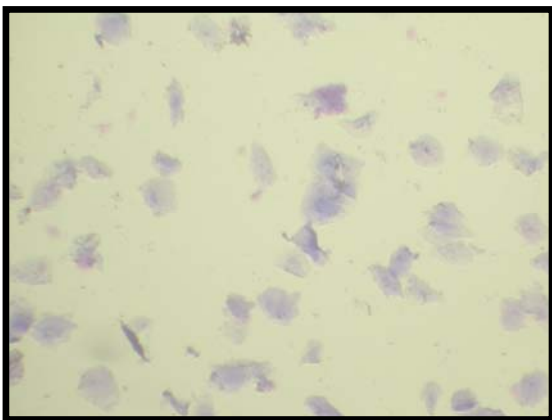


Figura 4A Frotis vaginal de perra en estro, se observan predominantemente células superficiales nucleadas y anucleadas. Tinción Giemsa 100X.

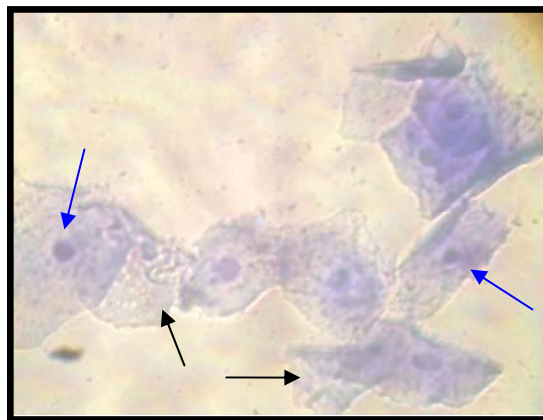


Figura 4B Células superficiales grandes predominantes durante el estro. Se destaca su núcleo picnótico (↑) o ausente (↑) y sus bordes planos y angulados. Tinción Giemsa 400X.

El porcentaje de células superficiales aumentó progresivamente en relación a las células parabasales e intermedias en las 6 perras, alcanzando el 100% entre los días 10 (perra 3), 12 (perra 1) y 14 (perras 2-4-5-6) del estudio (Gráfico 1).

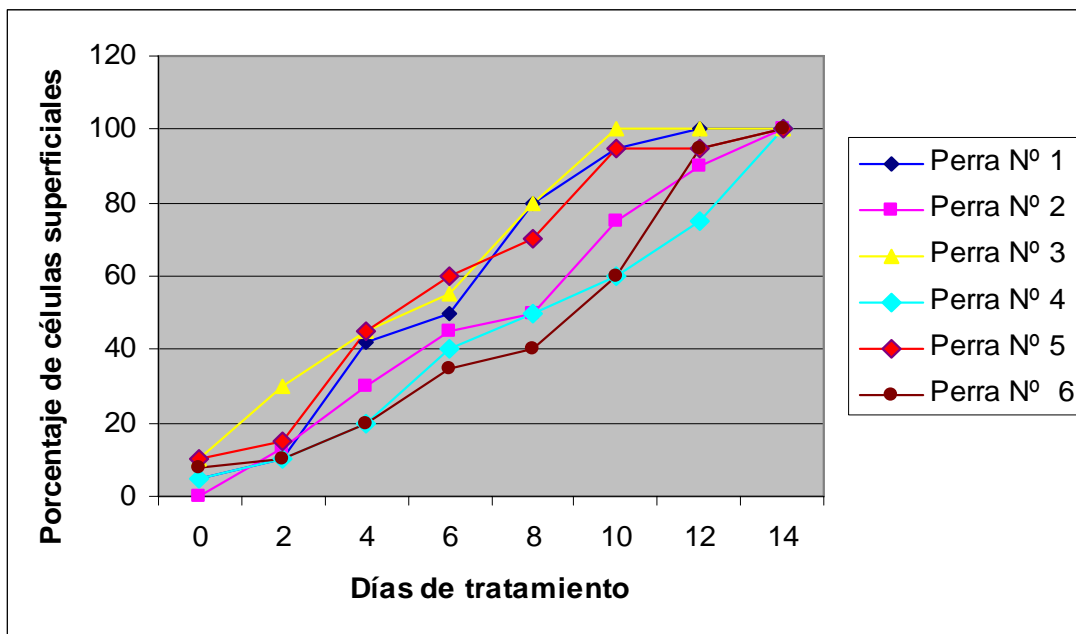


Gráfico 1. Porcentaje de células superficiales obtenidas mediante citología vaginal durante 14 días, de las 6 perras tratadas durante 10 días consecutivos con 10mg de HAP (Anexo 3).

5.2.1 Respuesta ovárica

El volumen del ovario derecho fluctuó entre 1,5 y 5,3 cm³ con un promedio de 2,5±1,4 cm³, en el caso del ovario izquierdo fluctuó entre 1,5 y 5 cm³ con un promedio de 2,6 ±1,3 cm³. El volumen total fue de 5,1 cm³. El peso del ovario derecho varió de 1,3 a 5,8g con un promedio de 2,3 ±1,8g, mientras que en el ovario izquierdo varió de 1 a 5,1g con un promedio de 2,2 ±1,5g. El peso total para ambos fue de 4,5 ± 3,3g (Cuadro 3).

Cuadro 3. Promedio y desviación estándar del volumen y peso ovárico, en las 6 perras tratadas con HAP y luego ovariectomizadas 7 días después de la administración de hCG.

PERRA N°	VOLUMEN OVARIOS(cm ³)			PESO OVARIOS (g)		
	O.D.	O.I.	TOTAL	O.D	O.I.	TOTAL
1	2,2	3,1	5	2,1	2,5	4,6
2	2	2,7	5	1,6	1,8	3,4
3	5,3	5	10,3	5,8	5,1	10,9
4	2	1,5	3,5	1,3	1	2,3
5	1,5	1,5	3	1,5	1,2	2,7
6	2,1	1,8	3,9	1,5	1,4	2,7
X ± D.E.	2,5±1,4	2,6 ±1,3	5,1± 2,6	2,3 ±1,8	2,2 ±1,5	4,5 ± 3,3

O.D: ovario derecho; O.I: ovario izquierdo; X: promedio; D.E: desviación estándar

En el cuadro 4 se muestra el número de folículos y cuerpos lúteos encontrados en los ovarios obtenidos en este estudio. En el ovario derecho, el número de folículos fluctuó entre 1 y 5 con un promedio de $3 \pm 1,5$, en el ovario izquierdo fluctuó entre 1 y 7 con un promedio de $4 \pm 2,2$. En promedio el número total de folículos fue de $7 \pm 1,8$. En el ovario derecho los cuerpos lúteos fluctuaron entre 5 y 10 con un promedio de $7 \pm 2,2$, mientras que en el ovario izquierdo varió de 5 a 13 con un promedio de $8 \pm 2,8$. En promedio el número total de cuerpos lúteos fue de $14,7 \pm 4,5$.

Cuadro 4. Promedio y desviación estándar del número de folículos y cuerpos lúteos en las 6 perras tratadas con HAP y luego ovariectomizadas 7 días después de la administración de hCG.

PERRA N°	NÚMERO DE FOLICULOS			NÚMERO DE C.L.		
	O.D.	O.I.	TOTAL	O.D	O.I.	TOTAL
1	2	6	8	7	8	15
2	4	3	7	5	6	11
3	4	7	11	10	13	23
4	4	3	7	6	5	11
5	1	1	2	6	7	13
6	5	4	7	8	9	18
X ± D.E.	3,3±1,5	4±2,2	7 ± 2,9	7± 1,8	8 ± 2,8	14,7± 4,5

O.D: ovario derecho; O.I: ovario izquierdo; X: promedio; D.E: desviación estándar; CL: cuerpo lúteo

6. DISCUSIÓN

6.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS PERRAS EN ESTUDIO.

Se llevó a cabo este estudio con el fin de probar la efectividad de la combinación del extracto hipofisiario equino (HAP) y hCG en la inducción de estro y ovulación. Para ello se seleccionaron 6 perras mestizas medianas con un peso similar, con el objetivo de facilitar el manejo y a su vez lograr una respuesta más homogénea. Esto difiere con lo realizado por Godoy (1998) en un estudio con HAP, ya que él utilizó hembras de diferente tamaño, con un peso que varió de 6 a 28 kg, debido a lo cual obtuvo una variación importante en sus resultados.

El porcentaje de células superficiales inicial fue en promedio de $6,6 \pm 3,2\%$. Lo cual se asemeja al 5% reportado por Bustamante (1987).

6.2 RESPUESTA DE LAS PERRAS AL TRATAMIENTO CON EXTRACTO HIPOFISIARIO (HAP).

Para evaluar la respuesta de las perras, se realizó citología vaginal diariamente, a partir del día anterior al inicio del tratamiento (día 0), para poder observar el incremento en el porcentaje de células superficiales, las que fueron aumentando progresivamente hasta alcanzar el 100% entre los días 10 a 14 del estudio. Esto concuerda con lo reportado por Corti (2003).

La aparición del proestro fluctuó entre los días 3 y 7 de iniciado el tratamiento, con un promedio de $5,3 \pm 1,4$ días y con un porcentaje de células superficiales promedio de 45%. El estro se determinó cuando el porcentaje de células superficiales fue $\geq 90\%$ en conjunto con los signos clínicos ya mencionados, de esta forma se presentó entre los 9 y 14 días de iniciado el tratamiento, con un promedio de $11,5 \pm 1,8$ días y con porcentaje de células superficiales promedio de 95%.

Tomando en consideración los resultados obtenidos es recomendable usar para una adecuada determinación del proestro y estro en las perras, tanto los signos externos como la citología vaginal en forma conjunta. Además Wallace y col (1982) recomiendan asociar a lo ya mencionado, la técnica ultrasonográfica y la determinación de LH y progesterona en el suero.

Sánchez (1998) describe que en un ciclo estral normal en la perra, el porcentaje de células superficiales al inicio del proestro es de alrededor de 20%, cifra menor a la reportada en este trabajo. Esto podría deberse a que la administración de gonadotrofinas exógenas llevó a un mayor desarrollo folicular y por lo tanto a mayores concentraciones de estrógenos circulantes, que inducirían una queratinización más temprana de lo normal en el epitelio vaginal de las perras.

En un ciclo reproductivo normal, la duración promedio del proestro es de 9 días Jeffcoate (1999). En este trabajo la duración promedio fue de 6,2 días. Una posible explicación de este acortamiento del proestro en perras inducidas, se debería al mayor número de folículos en crecimiento, causado por la estimulación hormonal exógena. Este aumento en el número de folículos produciría una mayor concentración de estrógenos plasmáticos, ocasionando la presentación del estro más tempranamente.

Los resultados obtenidos en este estudio, no difieren en forma relevantes de otras investigaciones realizadas con HAP utilizando el doble de la dosis. Corti (2003), reportó en 5 perras tratadas con 20 mg de HAP y una dosis única de 1000 UI de hCG, el inicio del proestro a los $6,3 \pm 1,5$ días, con un porcentaje de células superficiales promedio de 67% y para el estro, un promedio de $11,3 \pm 1,6$ días con un porcentaje de células superficiales de 100%. Por otra parte Bustamante (1987) en un estudio similar, reportó que el inicio del proestro se presentó a los $4,6 \pm 0,9$ días de iniciado el tratamiento con HAP, con un promedio de células superficiales del 59%, mientras que el estro, se presentó a los $13,4 \pm 2,8$ días, con un 100% de células superficiales. Godoy (1998) realizó un estudio en perras, en el cual se utilizó una dosis de 1mg/kg de HAP durante 10 días, seguida de una dosis única de 25mg de LH porcina para inducir estro y ovulación, en este estudio el inicio del proestro se presentó a los $4 \pm 0,8$ días de iniciado el tratamiento, con un promedio de células superficiales del 59 % y para el estro un promedio de $10,4 \pm 1,2$ días, con un promedio de células superficiales del 82 %.

6.2.1 Respuesta ovárica

No existieron diferencias relevantes entre el ovario derecho e izquierdo. En relación al volumen, el ovario derecho presentó un volumen promedio de $2,5 \pm 1,4$ cm³ y el ovario izquierdo $2,6 \pm 1,3$ cm³. El volumen total para ambos ovarios fue de $5,1 \pm 2,6$ cm³. Con relación al peso, el ovario derecho presentó un peso de $2,3 \pm 1,8$ g y del ovario izquierdo $2,2 \pm 1,5$ g. El peso total para ambos ovarios fue de $4,5 \pm 3,3$ g. Al analizar los resultados es posible observar que a pesar de que no existieron diferencias entre ambos ovarios, existieron algunas diferencias entre las perras, las cuales pueden deberse a la cantidad de folículos y cuerpos lúteos presentes.

Bustamante (1987), no obtuvo diferencias entre ovarios, reportando un volumen y peso de $2,3$ cm³ y $1,7$ g en el caso del ovario derecho y $1,8$ cm³ y $1,0$ g en el ovario izquierdo, con un volumen y peso total para ambos de $4,1$ cm³ y $2,16$ g. Por otra parte Corti (2003) reportó un peso de $2,1$ g para el ovario derecho y $1,9$ g para el izquierdo, con un total de $3,9$ g. Estos resultados arrojan un peso y volumen menor a los obtenidos en este trabajo, esto podría deberse a las diferentes concentraciones de gonadotropinas presentes en los HAP. También puede atribuirse al tipo de perras usadas, debido a que en este trabajo sólo se utilizaron perras de tamaño y peso similar, mientras que en los otros estudios mencionados se utilizaron perras de diferentes tamaños.

El número de folículos y cuerpos lúteos presentes en cada ovario no mostró diferencias. En el ovario derecho, el número de folículos en promedio fue $3 \pm 1,5$, en el ovario izquierdo $4 \pm 2,2$. En promedio el número total de folículos fue de $7 \pm 1,8$. En relación a los

cuerpos lúteos, en el ovario derecho se encontraron $7 \pm 2,2$ cuerpos lúteos y en el ovario izquierdo $8 \pm 2,8$. En promedio el número total de cuerpos lúteos fue de $14 \pm 4,5$. A pesar de que no existieron diferencias entre ovarios, si se presentaron algunas diferencias entre perras. La perra 3 fue la que tuvo mejor respuesta al tratamiento presentando 23 cuerpos lúteos, mientras que las perras 2 y 4 se encontraron 11, estas diferencias pueden estar dadas por la condición corporal del animal, la edad, la experiencia previa, el estado de progresión del anestro al inicio del tratamiento, estrés, etc.

El número de folículos encontrados en este estudio fue similar a lo reportado por Bustamante (1987) quien obtuvo un promedio de 3 folículos en el ovario derecho y 3,3 en el izquierdo, con un promedio de 6,3. Por otra parte el número de cuerpos lúteos encontrados en este trabajo, fue menor a lo reportado por Bustamante (1987), quien reportó un promedio de 36 cuerpos lúteos, 17 en el ovario derecho y 19 en el izquierdo. Corti (2003) reportó un promedio de $19 \pm 7,5$ cuerpos lúteos, 9 en el ovario derecho y 10 en el ovario izquierdo. Estas diferencias podrían explicarse por la diferente dosis de HAP utilizadas, ya que a una mayor dosis se produciría mayor estimulación ovárica y con ello mayor crecimiento folicular. Por otra parte la menor cantidad de cuerpos lúteos reportados en este estudio, podría atribuirse, a la baja condición corporal en la que se encontraban las perras, lo cual repercutiría en la respuesta al tratamiento.

6.3 CONCLUSIONES

La administración de HAP en dosis de 10 mg por animal, en combinación con hCG en dosis única de 1000 UI, fue eficaz en la inducción de estro y ovulación, lo cual fue demostrado a través de la signología clínica y los cambios citológicos evidenciados por la citología vaginal seriada. Además se obtuvo una tasa ovulatoria satisfactoria y dentro de los parámetros normales para la especie.

7. BIBLIOGRAFIA

- Araya J. 1995. Inducción de superovulación en murinos, ovinos y bovinos utilizando un Extracto Hipofisiario equino (HAP). *Tesis de Magíster*, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Badianand F, A Fontbonne, MC Maurel, B Siliart.1993. Fertilization time in the bitch relation to plasma concentration of estradiol, progesterone and luteinizing hormone and vaginal smears. *J Reprod Fert* 47, 63-67.
- Bustamante J.1987. Uso del extracto hipofisiario equino (HAP), en la inducción de celo en las perras. *Memoria de título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Concannon PW, M Temple.1989. Biology and Endocrinology of Ovulation, Pregnancy and parturition in the dog. *J Reprod Fert* 39, 3-25.
- Concannon PW, B Lasley, S Vanderlip. 1997. LH releasase induction of estrus and fertile ovulations in response to pulsatile administration of GnRH to anoestrus dogs. *J Reprod Fert* 51, 1-54.
- Concannon PW.1998. Physiology of canine ovarian cycles and pregnancy. En: C Linderforsberg. *Advances in canine reproduction*. SLU Uppsala, Sweden, Pp 9-20.
- Corti LM. 2003. Evaluación de la capacidad fecundante del semen congelado de perro (*Canis familiaris*) en ovas recuperadas de perras en celo inducido. *Memoria de título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Chaffaux S.1993. Reproduction of the cat and dog. En: Thibault C, Mc Levasseur, RH Hunter. *Reproduction in mammals and man*. Editorial Ellpeses, Paris, Francia, Pp 695-714.
- De los Reyes M, A Sánchez. 2000. Fisiología Reproductiva de la perra. *Tópicos de Reproducción en pequeños animales*. Santiago, Chile, Pp 13-28.
- England G, Concannon PW. 2002. Determinación del momento de apareamiento óptimo en la perra: Consideraciones básicas. En: PW Concannon, G England, J Verstegen, C Linderforbers. *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Editorial Ithaca, New York, USA, Pp 40-53.
- Farstad W.2000. Assisted reproductive thecnology in canid species. *Theriogenology* 53, 175-186.

- Feldman EC, Nelson R. 1991. Reproducción de la hembra canina. En: EC Feldman, R Nelson. *Endocrinología y Reproducción Canina y Felina*. Editorial Inter-Médica. Buenos Aires, Argentina, Pp 445-536.
- Feldman EC., Nelson R. 2000. Reproducción de la hembra canina. En: Feldman EC. *Endocrinología y Reproducción Canina y Felina*. Editorial Inter-Médica. Buenos Aires, Argentina, Pp 450-540.
- Fernández PA, RA Bowen, AC Kostas, AC Sawyer, HR Olson. 1987. Luteal function in the bitch: changes during diestrus in pituitary concentration of LH and the number of luteal receptors for luteinizing hormone and prolactin. *Biol Reprod* 37, 804-811.
- Galac S, HS Kooistra, J Butinar, M Bevers, SJ Dieleman, AC Okkens. 2000. Termination of mid-gestation pregnancy in bitches with aglepristone, a progesterone receptor antagonist. *Theriogenology* 53, 941-950.
- Gatica R. 1985. Hormonoterapia reproductiva. VII Jornadas Latinoamericanas de Buiatría. Valdivia, Chile, Pp 43.
- Gobello C, Y Corrada. 2001. La citología vaginal de la perra. En: *Actualización de temas de Reproducción Animal*. Editorial Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina, Pp 419-429.
- Godoy R. 1998. Descripción clínica citológica y ecográfica del celo inducido con extracto hipofisiario equino (HAP) en la perra. *Memoria de título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Hafez ESE. 2000. Ciclos Reproductivos. En: Hafez ESE. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. Editorial McGraw Hill Interamericana, México DF, México, Pp 89-107.
- Hernández AE. 1991. Inducción de estro y ovulación en borregas de un año fuera de la época reproductiva. *Memoria de título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Hernández PJ, M Aguado, R Fernández, R Gutiérrez, IA Córdova. 2003. Métodos farmacológicos utilizados para inducir estro en perras. *Rev Salud Anim* 25 (1), 5-10.
- Jeefcoate I. 1999. Reproducción canina. En: P Broers. *Compendium de reproducción animal*. Editorial Laboratorios Intervet S.A., Madrid, España, Pp 125-157.
- Kutzler MA. 2005. Induction and synchronization of estrus in dogs. *Theriogenology* 64, 766-775.

- Kutzler MA. 2007. Estrus induction and synchronization in canids and felids. *Theriogenology* 68, 354-374.
- McDonald LE. 1996. Hormonas de la hipófisis. En Booth LH, LE McDonald. *Farmacología y terapéutica veterinaria*. Editorial Acribia SA. Zaragoza, España, Pp 599-600.
- Moller LA. 1990. Sincronización de estro e inducción de partos múltiples en ovejas. *Memoria de título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Moore N, J Shelton. 1964. Response of the ewe to a horse anterior pituitary extract. *Nature* 194, 1283-1284.
- Olson PN, RA Bowen, MD Behrendt. 1984. Concentration of progesterone and LH in the serum of diestrous bitches before and after hysterectomy. *Am J Vet Res* 45, 149-153.
- Parvizi N. 2000. Neuroendocrine regulation of gonadotropins in male and the female. *Anim Reprod Sci* 60, 31-47.
- Pineda MH. 1991. Patrones reproductivos en perros. En: McDonald LE, MH Pineda. *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. Editorial Interamericana Mcgraw-Hill, México DF, México. Pp 448-473.
- Salas F.1984. Inducción de superovulación en cabras. *Memoria de título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Sánchez A. 1998. Ciclo sexual y fisiología reproductiva de la perra. *Curso de Educación Continua: Tópicos de Clínica Reproductiva e Inseminación Artificial en Caninos*, Valdivia, Chile, Pp 13-16.
- Sciarresi I, J Correa, R Gatica. 1984. Inducción de Ovulación en terneras. *Arch Méd Vet* 16, 99-101.
- Silva ME.1996. Evaluación de dos métodos de inducción de mellizos mediante transferencia de embriones. *Memoria de título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Stornelli MC, F Gimenez, CM Tittarelli, C A Savignone, R de la Sota. 2006. Inducción de ciclos estrales en la perra: Actualización bibliográfica. *Analecta Vet* 26, 39-45.
- Tsutsui T.1989. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fert* 39, 269-275.
- Wallace S, M Mahaffefy, D Miller, P Thompson, P Chacraborty. 1992. Ultrasonographic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the estrus cycle. *Am J Vet Res* 53, 209-215.

8. ANEXOS

ANEXO 1

Preparación del Extracto Hipofisiario Equino (HAP), descrito por Moore y Shelton (1964).

- 1.- Recolección y congelación de hipófisis equinas.
- 2.- Trituración y homogenización de las hipófisis congeladas en una solución de cloruro de sodio al 2%, en proporción de 4 ml. de solución por gramo de hipófisis.
- 3.- Centrifugación del homogenizado a 1500 rpm. por 20 min.
- 4.- El sobrenadante es filtrado a través de lana de vidrio y se determina de su volumen (reservar).
- 5.- Resuspensión del residuo en cloruro de sodio y nueva centrifugación.
- 6.- Filtración del sobrenadante a través de lana de vidrio y determinación de volumen.
- 7.- Eliminación del residuo resultante.
- 8.- Adición al sobrenadante de 4,2 volúmenes de alcohol de 96° y mantención en reposo hasta el día siguiente a temperatura de refrigeración.
- 9.- Filtración a través de género en matraz Kitasato conectado a un sistema de vacío y posterior lavado del precipitado obtenido, primero con alcohol de 96° y luego con éter.
- 10.- Secado del precipitado en campana de vidrio al vacío conteniendo en su interior sílica gel.
- 11.- Remoción, pesaje y molido del precipitado y posterior almacenamiento a temperatura de refrigeración.
- 12.- Resuspensión previo a su uso en agua destilada estéril o en suero fisiológico estéril.

La efectividad del extracto hipofisiario (HAP) fue probada, previo a ser utilizado en las perras, en ratones Rockefeller, facilitados por el Instituto de Inmunología de la Universidad Austral de Chile. Para este fin se utilizaron 6 hembras prepúberes de entre 20 y 23 días de edad, las cuales fueron a su vez, divididas en 3 grupos (de 2 hembras cada uno). Al primer grupo se le utilizó como control, al segundo grupo se le inyectó 6mg de HAP intraperitoneal,

en 2 dosis de 3 mg cada 12 horas, y finalmente al tercer grupo se le inyectó una dosis única de 7,5 mg de HAP vía IP. Una vez transcurridas 45 horas desde la primera inyección de HAP se les inyectó a las hembras 5 UI de HCG vía IP y se juntaron con un macho adulto, mayor a 80 días. A las 48 horas las hembras fueron sacrificadas para pesarlas y luego extraer útero y ovarios para registrar el peso del tracto reproductivo y registrar las diferencias entre los 3 grupos.

Cuadro 1: Peso del animal (g), y peso de útero/ovarios (mg), en las 2 hembras del grupo control y en las 4 hembras tratadas con HAP, para probar su efectividad.

HAP	PESO ANIMAL (g)	PESO UTERO/OVARIOS (mg)	X PESO UTERO/OVARIOS (mg)
	18,5	36,2	
Control	17,4	36,3	36,25
	19,1	60,9	
Grupo 1 (3mg x2)	19,8	71,8	66,35
	19,8	92,8	
Grupo 2 (7,5mg)	19,2	89,6	91,2

X: promedio

Con esto se comprobó la efectividad de la HAP preparada según el método descrito por Moore y Shelton (1964).

ANEXO 2

FICHA DE IDENTIFICACIÓN

- Nombre:
- Raza:
- Edad estimada:
- Peso:
- Condición corporal:
- Días de administración de HAP:
- Día de administración de hCG:

SIGNOS CLÍNICOS:

PROESTRO		
	Presente	ausente
Edema y tumefacción vulvar		
Descarga vulvar sanguinolenta		

ESTRO		
	Presente	ausente
Reducción del edema y descarga vulvar		
Reflejo de inmovilidad		
Desviación de la cola		
Monta a otras hembras del grupo		

EVALUACIÓN OVÁRICA:

	OVARIO DERECHO	OVARIO IZQUIERDO
Peso (g)		
Tamaño (Mm.)		
Volumen (cm ³)		
Nº de folículos		
Nº de Cuerpos lúteos		

ANEXO 3

Cuadro 2: Porcentaje de células superficiales, obtenido mediante citología vaginal, durante 14 días, en las 6 perras tratadas con 10 mg de HAP durante 10 días consecutivos.

% Células Superficiales						
Días	Perra N° 1	Perra N° 2	Perra N° 3	Perra N° 4	Perra N° 5	Perra N° 6
0	5	0	10	5	10	8
2	10	13	30	10	15	10
4	42	30	45	20	45	20
6	50	45	55	40	60	35
8	80	50	80	50	70	40
10	95	75	100	60	95	60
12	100	90	100	75	95	95
14	100	100	100	100	100	100

9. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a mi familia. A mi padre por inculcar en mí desde niña, el amor y el respeto por los animales. A mi madre por su preocupación, cariño y apoyo incondicional. A mi hermano por llenar mi vida con su alegría.

A mi profesor patrocinante Dr. Renato Gatica, por mostrarme que el camino del conocimiento nos hace mejores profesionales y personas.

A mi pololo Camilo Ríos, por ser mi apoyo incondicional, por estar ahí cada vez que tuve dificultades, por comprenderme y ayudarme a concluir esta Memoria de Título de la mejor forma posible. Te amo mucho mi amor.

A Marcela Peirano por ser mi gran compañera de trabajo y amiga, por enseñarme a ponerme de pie después de los tropiezos.

A mis queridos amigos, por acompañarme en este largo camino, por compartir conmigo sus penas y alegrías, por enseñarme el valor de la amistad.

Al Instituto de Reproducción Animal por acogerme y ser una segunda familia para mí, por compartir sus consejos y enseñarme el valor del compañerismo.

A mis profesores por guiarme en este largo camino.