

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FERTILIDAD DE LA PERRA BULLDOG
INGLÉS DESPUÉS DE LA DEPOSICIÓN UTERINA QUIRÚRGICA DEL
SEMEN FRESCO

Tesis

Que presenta CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ
como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Torreón, Coahuila

Mayo 2020

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FERTILIDAD DE LA PERRA BULLDOG
INGLÉS DESPUÉS DE LA DEPOSICIÓN UTERINA QUIRÚRGICA DEL
SEMEN FRESCO

Tesis

Elaborada por CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ como requisito parcial
para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Producción Agropecuaria
con la supervisión y aprobación del comité de asesoría

Dra. Leticia Romana Gaytán Alemán
Asesor principal

Dr. Miguel Ángel Mellado Bosque
Asesor

Dr. Francisco Gerardo Véliz Deras
Asesor

Dra. Leticia Romana Gaytán Alemán
Jefe del Departamento de Postgrado

Dr. Marcelino Cabrera De La Fuente
Subdirector de Postgrado

Agradecimientos

Primeramente, a Dios por bendecirme la vida, por guiarme a lo largo de estos años de vida.

A mis padres Roberto y Clara por el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad, por ser los principales en creer en mí, por sus consejos. Mis hermanos por el gran apoyo durante todos estos años. A Mis hijos Santiago, Raúl, Roberto y Clara María, por ser un pilar fundamental de mi vida y motor cada día.

A mis asesores docentes Dra. Leticia R. Gaytán Alemán, Dr. Miguel Ángel Mellado Bosque, Dr. Fco. Gerardo Véliz Deras; de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de este trabajo de manera especial.

Al Dr. Homero, por su valiosa participación en la culminación de este trabajo de investigación.

Al MVZ Daniela Divani y MVZ Emanuel; por su apoyo incondicional en la elaboración del experimento.

Mi amiga; Aurelia por apoyar en cada momento y estar al pendiente de toda la papelería siendo fundamental para mi desarrollo académico.

A cada uno de mis amigos que durante esta investigación formaron parte de alguna manera.

Índice General

Lista de Cuadros	ii
Lista de Figuras	iii
Resumen	iv
Abstract	v
INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	3
Objetivo general	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Importancia de las Biotecnologías Reproductivas	4
Ciencia y aplicación de la cría de animales de compañía	5
Etapas del ciclo estral de la perra	7
Anatomía de los órganos genitales de la perra	10
Fisiología de la reproducción en perras	11
Gestación	15
Parto	19
Inseminación Artificial (IA)	20
Manejo hormonal del desempeño reproductivo en perras	23
Oxitocina: su papel en la reproducción y en la IA	23
MATERIALES Y MÉTODOS	27
RESULTADOS	32
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	39
LITERATURA CITADA	40

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Atributos de las etapas del ciclo estral de la perra	8
Cuadro 2. Particularidades de estudios donde se aplican las técnicas de IA. .	22

Lista de Figuras

Figura 1. Estrategia de los programas de crianza, modificado de Oldenbroek y Waaij (2014).....	6
Figura 2. Comportamiento de las hormonas durante las diferentes fases del ciclo estral en la perra, modificado de Saleh y Shamkhi (2018).....	7
Figura 3. Partes del tracto reproductivo de la hembra, modificado de Aspinall (2014).	10
Figura 4. Interacción hipotálamo-hipófisis-ovario durante la fase folicular del ciclo estral en la perra, modificado de Linde-Forsberg (2001).	13
Figura 5. Cambios en las concentraciones sanguíneas de progesterona, estrógeno y hormona luteinizante, en relación con la ovulación, y los períodos fértiles y de fertilización de la perra, modificado de Linde-Forsberg (2001).....	15
Figura 6. Secuencia del desarrollo prenatal, adaptado de Pretzer (2008).	17
Figura 7. Diagnóstico de gestación de una perra Bulldog Inglés de 2.5 años. Tomado de Sanchez <i>et al.</i> , (2010).....	18

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del peso corporal, la deposición de oxitocina en el útero en la inseminación artificial (AI), la citología vaginal, la concentración sérica de progesterona (P4) en la AI, el volumen de semen y las células espermáticas totales por IA en el porcentaje de partos y tamaño de la camada de perras Bulldog inglés después de la deposición de semen quirúrgico intrauterino. Setenta y ocho perras Bulldog inglés fueron inseminadas artificialmente mediante infusión de semen (el número de células espermáticas inseminadas osciló entre 300 y 2500×10^6) en el cuerpo uterino con semen fresco sin extensor y bajo anestesia general. El porcentaje de partos fue mayor ($P < 0.05$) en las perras con > 23 kg que en las perras con < 23 kg (83.9 vs 63.8%). El porcentaje de partos fue mayor ($P < 0.05$) en perras con $> 45\%$ de epitelio cornificado vaginal en la IA (82.6%) que en las que tuvieron $< 45\%$ de epitelio cornificado completado (56.3%). Los porcentajes de partos se vieron influenciadas por el volumen de semen en la IA (54.3% vs 86.1% para perras que recibieron < 4 mL o > 4 mL de semen; $P > 0.01$). El tamaño de la camada fue mayor ($P < 0.05$) en las perras > 23 kg que en los animales más livianos (3.72 ± 1.79 y 2.30 ± 1.46 crías por camada, respectivamente). El tamaño de la camada no se vio influenciado por la concentración de espermatozoides, el volumen del semen, la citología vaginal, la concentración sérica de P4 y la infusión de oxitocina en el útero en la IA ($P > 0,1$). Los resultados de este estudio indican que el aumento del peso corporal de las perras de Bulldog Inglés está relacionado con mayores porcentajes de crianza y mayor tamaño de la camada. Además, $> 45\%$ de las células vaginales cornificadas superficiales (escamosas) en AI y > 4 mL de volumen de semen maximizan los porcentajes de crianza en esta raza de perros.

Palabras clave: Semen fresco de perro, inseminación artificial, tamaño de la camada, oxitocina, porcentaje de parto.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of body weight, oxytocin deposition in the uterus at artificial insemination (AI), vaginal cytology, serum progesterone (P4) concentration at AI, semen volume and total sperm cells per AI on whelping rate and litter size of English Bulldog bitches following intrauterine surgical semen deposition. Seventy-eight English Bulldog bitches were artificially inseminated via semen infusion (number of sperm cells inseminated ranged from 300 to 2500 × 10⁶) at the uterine body with fresh semen without extender and under general anesthesia. Whelping rate was greater (P < 0.05) in bitches with > 23 kg than bitches with < 23 kg (83.9 vs 63.8%). Whelping rate was greater (P < 0.05) in bitches with > 45% vaginal cornified epithelium at artificial insemination (AI) (82.6%) than animals with < 45% completed cornified epithelium (56.3%). Whelping rates were influenced by the semen volume at AI (54.3 % vs 86.1 % for bitches receiving < 4 mL or > 4 mL of semen; P > 0.01). Litter size was greater (P < 0.05) in bitches >23 kg than lighter animals (3.72 ± 1.79 and 2.30 ± 1.46 pups per litter, respectively). Litter size was not influenced by sperm concentration, semen volume, vaginal cytology, serum P4 concentration and infusion of oxytocin in the uterus at AI (P > 0.1). The results of this study indicate that increasing body weight of English Bulldog bitches is related to higher whelping rates and larger litter size. Also, > 45% of superficial cornified vaginal cells (squamous) at AI and > 4 mL semen volume maximize whelping rates in this breed of dogs.

Key words: Dog fresh semen, artificial insemination, litter size, oxytocin, whelping rate.

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es una técnica de reproducción asistida que se ha convertido en un medio de reproducción muy común para muchas razas de perros (Thomassen *et al.*, 2009; Mason, 2016). La IA es en realidad una necesidad en los Bulldog inglés, debido a que pocos ejemplares pueden aparearse naturalmente por su conformación anatómica (Packer *et al.*, 2012) y su incapacidad para regular su temperatura a través del jadeo si se produce una "atadura" prolongada entre el macho y la hembra durante el apareamiento natural, lo cual se ve agravado por el síndrome de la vía aérea braquicefálica, común en esta raza (Kaye *et al.*, 2015).

En perras, la IA utilizando semen fresco o congelado ha existido durante varias décadas, pero con los años esta técnica ha mejorado, lo que ha resultado en un aumento de los porcentajes de concepción (Mason, 2018). Algunos factores críticos para el éxito de esta técnica reproductiva son la definición del tiempo óptimo para la IA y el surgimiento de métodos para evaluar este plazo de tiempo. Además, se ha establecido que el semen congelado / descongelado debe depositarse en el útero en lugar de la vía vaginal (Daskin *et al.*, 2003; Gobello y Corrada, 2003; Hye *et al.*, 2007).

Las opciones para la deposición de semen intrauterino son por inseminación transcervical o quirúrgica. Dado que la cateterización del cuello uterino en la perra es un procedimiento desafiante y merece habilidad y experiencia, para muchos médicos, la opción quirúrgica es el método preferido porque es fácil de realizar, no requiere herramientas especiales de inseminación, aunque necesita buenas habilidades quirúrgicas y la deposición de semen se realiza una sola vez. La inseminación quirúrgica tiene algunos inconvenientes, incluido el riesgo asociado con la anestesia general y la cirugía y el hecho de que solo se puede hacer una sola inseminación.

No obstante, para los Bulldog inglés la inseminación artificial está indicada porque muchos de ellos no pueden aparearse o parir de forma natural. El conocimiento de algunos factores que afectan la fertilidad de esta raza de perros cuando se utiliza la IA quirúrgica es incompleto, además, el éxito en relación con el embarazo es limitado y consiste en tamaños de muestra pequeños cuando se usa inseminación intrauterina.

Hipótesis

La citología vaginal, la concentración sérica de progesterona (P4), la deposición de oxitocina en el útero durante la inseminación artificial (AI), el volumen de semen y las células espermáticas totales por IA posterior a la deposición de semen quirúrgico intrauterino, influirá en el porcentaje de partos y tamaño de la camada de perras Bulldog inglés.

Objetivo general

Evaluar la citología vaginal, las concentraciones séricas de progesterona, el peso corporal, las características del semen y el efecto del uso de oxitocina, en el porcentaje de partos y el tamaño de la camada de perras Bulldog Inglés.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia de las Biotecnologías Reproductivas

Las técnicas de reproducción asistida pueden ir desde la simple asistencia a un apareamiento natural en un ambiente controlado hasta la clonación, estas técnicas son esenciales para mejorar el rendimiento reproductivo, ayudar a la preservación de la biodiversidad e incentivar el desarrollo de la investigación, para ello se puede recurrir al empleo de la inseminación artificial, la maduración, la fertilización, la producción y transferencia de embriones y la crioconservación de gametos en animales con valor comercial o afectivo (Gobello y Corrada, 2003).

Las especificidades de la anatomía, fisiología y biología de la reproducción canina requieren numerosas adaptaciones, aunque la mayoría de las técnicas son poco eficientes, el interés significativo para el perro como animales de compañía, así como las ventajas asociadas con este gran modelo animal para enfermedades humanas o como un modelo para la protección de especies de carnívoros en peligro de extinción, deben conducir a procedimientos más avanzados, como en humanos o bovinos, y a un progreso significativo en las biotecnologías de reproducción canina (Verstegen *et al.*, 2011).

En años recientes, las biotecnologías reproductivas comenzaron a reemplazar las técnicas convencionales, la aparición y aplicación de tecnologías reproductivas modernas han abierto muchas áreas de estudio y manipulación de los fenómenos reproductivos tanto *in vitro* como *in vivo*, para mejorar el rendimiento reproductivo (Ivanova-Kicheva *et al.*, 2015; Choudhary *et al.*, 2016).

Ciencia y aplicación de la crianza de animales de compañía.

Oldenbroek y Waaij (2014), mencionan que desde hace 250 años la humanidad comenzó a crear razas con ayuda de la selección artificial. Hoy en día, la cría de animales de compañía, específicamente en perros, los programas de crianza son manejados por criadores individuales que colaboran en la creación de un libro de registros o una asociación de criadores (Figura 1). El objetivo de la cría de animales busca mejorar rasgos importantes al cambiar sus habilidades genéticas, estos rasgos están determinados por los requisitos y deseos de la sociedad que podrían cambiar con el tiempo. No obstante, existen aspectos muy importantes que deben ser considerados en la cría de animales:

1. Para que la crianza selectiva tenga éxito, es esencial que el rasgo bajo selección sea heredable.
2. Que los animales tengan diferentes antecedentes genéticos para que la selección sea posible
3. La dirección de selección está definida por los humanos y ellos deciden qué animales pueden aparearse y producir miembros de la próxima generación.
4. El éxito de la cría de animales puede juzgarse observando un cambio en el fenotipo promedio de la población de una generación a la siguiente.
5. El éxito puede medirse como el resultado acumulativo de múltiples generaciones de selección y las decisiones de mejoramiento se toman con el futuro en mente.

Las estrategias y esfuerzos para controlar la reproducción en animales de compañía han enfatizado la perpetuación de habilidades superiores y otros rasgos "deseables". Estos objetivos se logran mediante la cría selectiva. Mientras que en el pasado la reproducción selectiva realizada por medios "naturales" requería mucho tiempo para hacer cambios perceptibles, hoy en día, la mejora selectiva es asistida por varias tecnologías de reproducción asistida combinadas

con enfoques biotecnológicos avanzados (Basrur y King, 2005). Además, las especificidades de la fisiología reproductiva de los caninos domésticos requieren numerosas adaptaciones a los procedimientos de reproducción asistida que se utilizan de manera eficiente en otras especies. Por ejemplo, las técnicas que han demostrado ser eficientes en felinos resultan en tasas de producción bajas cuando se aplican a los perros. A pesar de la falta de conocimientos fundamentales sobre la fisiología reproductiva de las perras, las necesidades que surgen de estos campos probablemente actuarán como un potente impulso para progresar las biotecnologías reproductivas en el perro (Chastant-Maillard *et al.*, 2010).

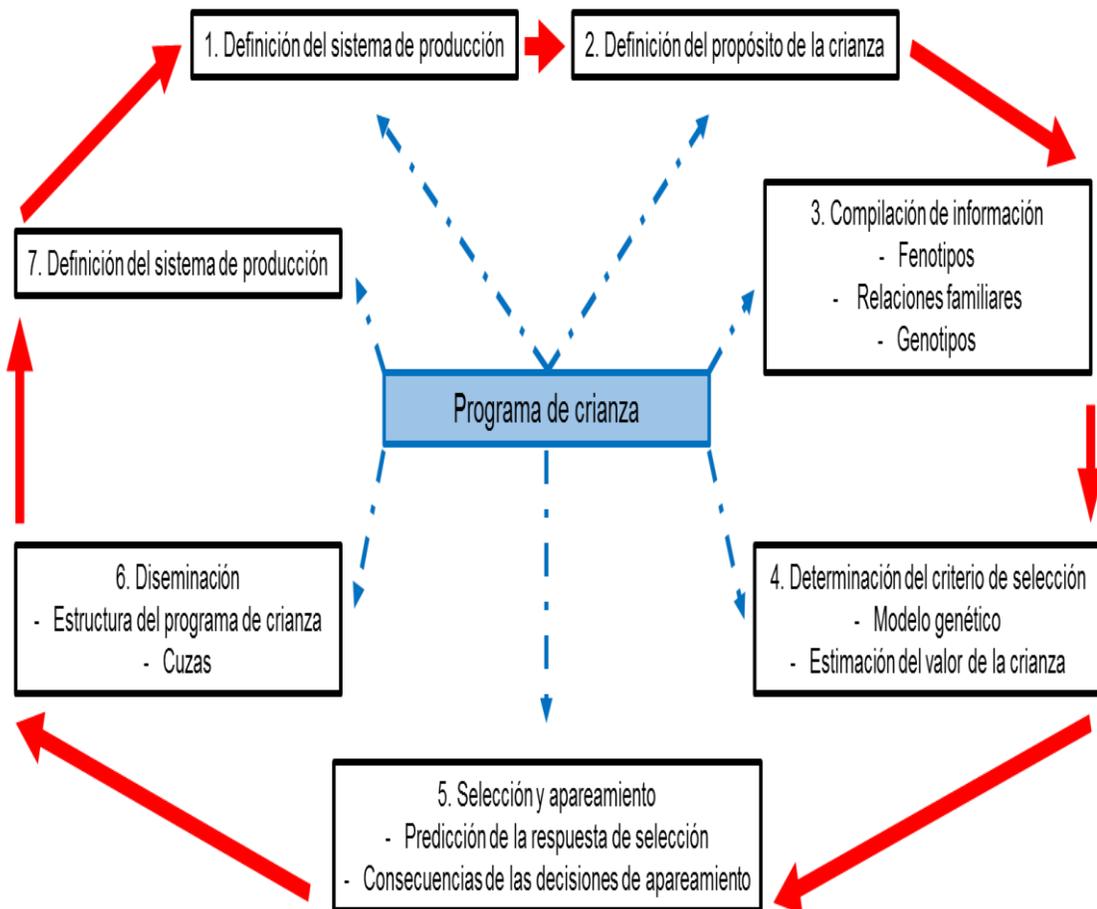


Figura 1. Estrategia de los programas de crianza, modificado de Oldenbroek y Waaij (2014).

Etapas del ciclo estral de la perra

En esta especie el ciclo estral se divide en cuatro fases: proestro, estro, metaestro y anestro, aunque algunas veces se prefiere el término diestro en lugar de metaestro, durante la fase luteal (Linde-Forsberg, 2001; Haşegan *et al.*, 2012). En la Figura 2, se puede apreciar el comportamiento de las hormonas durante el ciclo, mientras que en el Cuadro 1 se describen algunas particularidades del mismo.

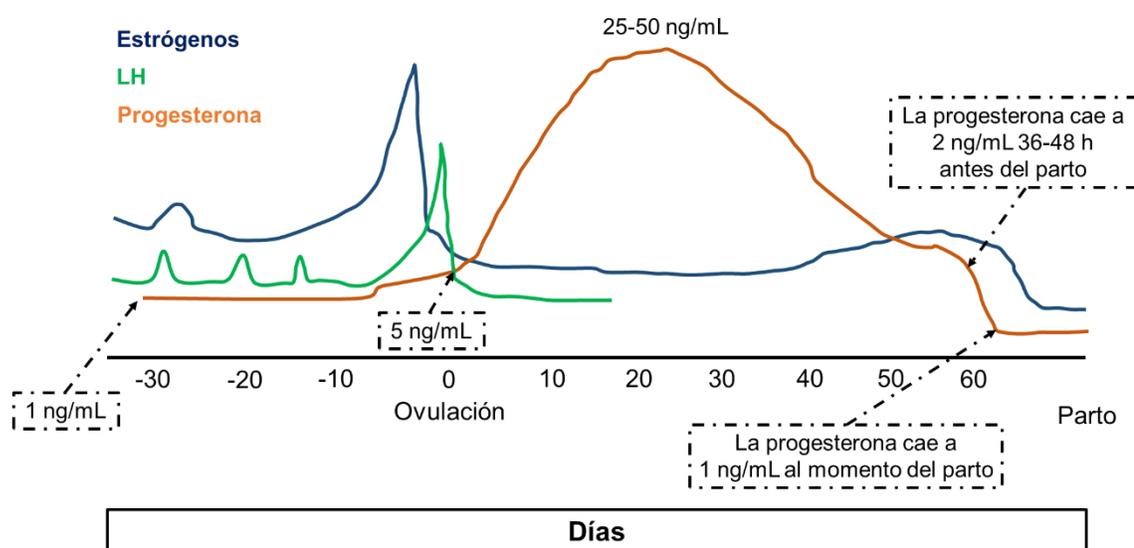


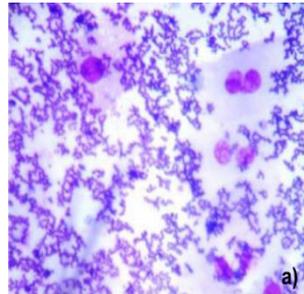
Figura 2. Comportamiento de las hormonas durante las diferentes fases del ciclo estral en la perra, modificado de Saleh y Shamkhi (2018).

Cuadro 1. Atributos de las etapas del ciclo estral de la perra, adaptado de Reddy *et al.* (2011); Haşegan *et al.* (2012), Root-Kustritz (2012) y Nagashima *et al.* (2016).

		Fase			
		Proestro	Estro	Metaestro o Diestro	Anestro
Característica		Inicia con de sangrado vulvar, hasta la primera aceptación de cópula, su duración media es de 9 días, pero muestra una variación considerable, de 0 a 27 días	La duración de esta fase es altamente variable (3 a 21 días), puede darse o no la fecundación y gestación	Inicia cuando la perra ya no está dispuesta a aceptar al macho, hay una fase lútea de progesterona circulante elevada (presencia de cuerpos lúteos activos), tiene una duración media de 70 días, hacia el final del diestro, la función del cuerpo lúteo disminuye a medida que la perra entra en un período prolongado de anestro (perras preñadas 62–64 días, perras no gestantes 49–79 días)	Fase entre el final del metaestro y el comienzo del proestro, se caracteriza por la falta de cualquier comportamiento sexual o actividad gonadal, incluso, las concentraciones de progesterona circulante llegan a su punto más bajo, tiene una duración es variable, de 1 a 10 meses
Cambios físicos		Vulva hinchada y turgente	Vulva suave al tacto	Posible desarrollo mamario con gestación verdadera o pseudociesis	Ninguno
Secreción vulvar		Sero-sanguinolenta	Color pajizo	Flujo mucoide leve en la etapa temprana	No se observa
Comportamiento		Los machos muestran interés; las perras no permitirán la monta o apareamiento	La perra permite la monta y el apareamiento	Ninguno	Ninguno
Eventos endocrinos		Desarrollo folicular; aumento de la concentración sérica de estrógenos	Caída de los estrógenos con aumento subsecuente de LH y ovulación; aumento	La progesterona aumenta y al final cae abruptamente (perras gestantes) o	La hormona folículo estimulante se encuentra relativamente elevada en

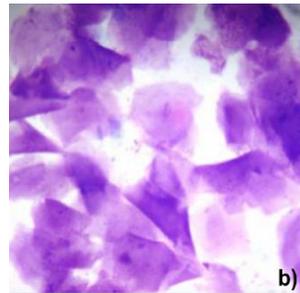
Citología vaginal

Incremento gradual en el porcentaje de células cornificadas, disminución de células polimorfonucleares (a: Eritrocitos y células parabasales)



preovulatorio
de progesterona

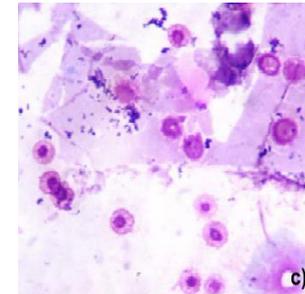
Más del 50% de células cornificadas se observan anucleares, no hay presencia de sin polimorfonucleares (b: Células superficiales)



de

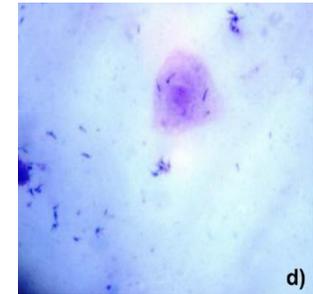
disminuye gradualmente (perras no gestantes). La producción de progesterona es compatible con la secreción de LH y prolactina

Retorno abrupto a células epiteliales no codificadas, gran número de PMN al inicio de la etapa (c: Células intermedias y neutrófilos)



todo momento, las concentraciones de homona luteinizante aumentan en la etapa posterior a la estimulación con estrógeno

Células epiteliales no codificadas, presencia ocasional de polimorfonucleares (d: Célula parabasal)



Anatomía de los órganos genitales de la perra

En una perra no gestante, los ovarios y el útero se encuentran dentro de la cavidad abdominal. El cuello uterino, la vagina y el vestíbulo conducen a través de la cavidad pélvica y el perineo hacia el exterior del cuerpo. Durante la gestación, el peso de los fetos en desarrollo empuja el cuello uterino hacia abajo sobre el borde del borde pélvico hacia la cavidad abdominal. Las perras son especies multíparas, y su tracto bicorne (es decir, con dos cuernos) está diseñado para llevar varios fetos a la vez. Los dos cuernos uterinos son largos y se unen en la línea media para formar un pequeño cuerpo uterino, como se ilustra en la figura 3 (Aspinall, 2014;).

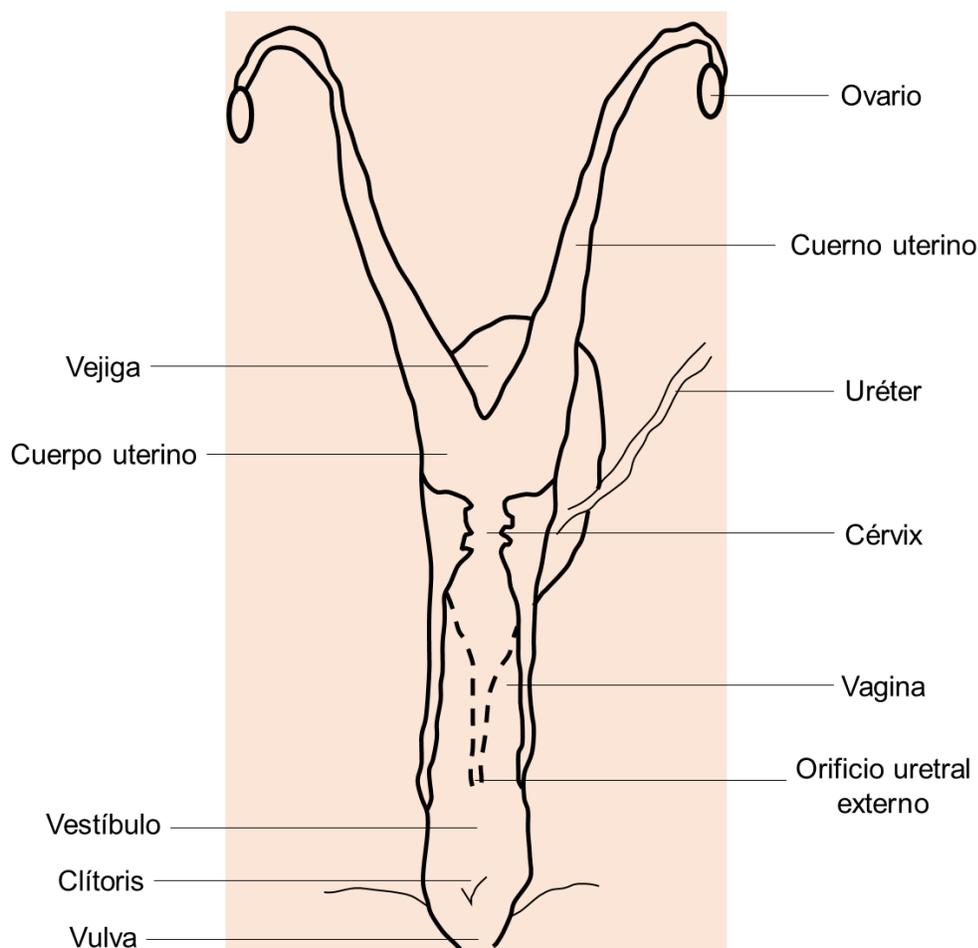


Figura 3. Partes del tracto reproductivo de la hembra, modificado de Aspinall (2014).

El sistema reproductivo de la perra desempeña funciones tales como la producción de óvulos, los cuales, una vez fertilizados pueden convertirse en fetos, que al momento del parto utilizarán esta estructura para llegar fuera del cuerpo. Por otra parte, existe una secreción hormonal para crear el entorno adecuado para la producción de óvulos y la supervivencia de los fetos en desarrollo (Aspinall, 2011).

Fisiología de la reproducción en perras

A diferencia de otros cánidos silvestres, la fisiología reproductiva canina tiene características únicas, presenta una estacionalidad modificada por los efectos de la domesticación (Gobello y Corrada, 2003), con uno, dos o incluso tres ciclos estrales y que trae a consecuencia la gran variación en su duración entre las distintas perras, el período combinado de proestro y estro puede durar de 7 a 27 días o más, lo que hace que sea difícil decidir cuándo realizar el apareamiento o la inseminación artificial (Linde-Forsberg, 2001).

Los eventos reproductivos, están orquestados por el hipotálamo que, en parte, produce y libera la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), esta a su vez influye en la glándula pituitaria para secretar la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Estas hormonas gonadotróficas inducen el desarrollo folicular ovárico y la ovulación. El eje hipotálamo-hipófisis-gonadal se regula a través de mecanismos de retroalimentación intrincados (Figura 4), por lo que las hormonas gonadales, al alcanzar una cierta concentración a través de la retroalimentación negativa regulan la liberación adicional de GnRH, y por lo tanto FSH y LH (Linde-Forsberg, 2001).

Durante la fase media y tardía del anestro, hay un aumento en la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina hipotalámica (GnRH) que provoca un aumento en la hormona estimulante del folículo (FSH) y la liberación de LH episódica. La FSH desempeña un papel crucial en el inicio de la foliculogénesis y la aparición de proestro. Hacia el final del proestro, la oleada de LH estimula un rápido aumento de los folículos maduros y la luteinización preovulatoria que lleva a la ovulación de 40 a 50 h después del pico de LH. El comportamiento del estro y la ovulación se producen en presencia de la disminución de los estrógenos circulantes (Haşegan *et al.*, 2012).

Por último, la glándula pituitaria anterior secreta la hormona estimulante del folículo (FSH), que estimula las células germinales en el ovario, para que se conviertan en folículos maduros y segreguen estrógeno. El estrógeno prepara el tracto para el coito e inicia el comportamiento asociado con el estro. La glándula pituitaria anterior también secreta hormona luteinizante (LH) para hacer que los folículos liberen sus óvulos; el tejido restante se luteiniza para formar los cuerpos lúteos. Cada cuerpo lúteo secreta progesterona, que estimula el revestimiento del tracto reproductivo para prepararse para la implantación y nutrición de los óvulos fertilizados y también afecta las glándulas mamarias (Aspinall, 2014).

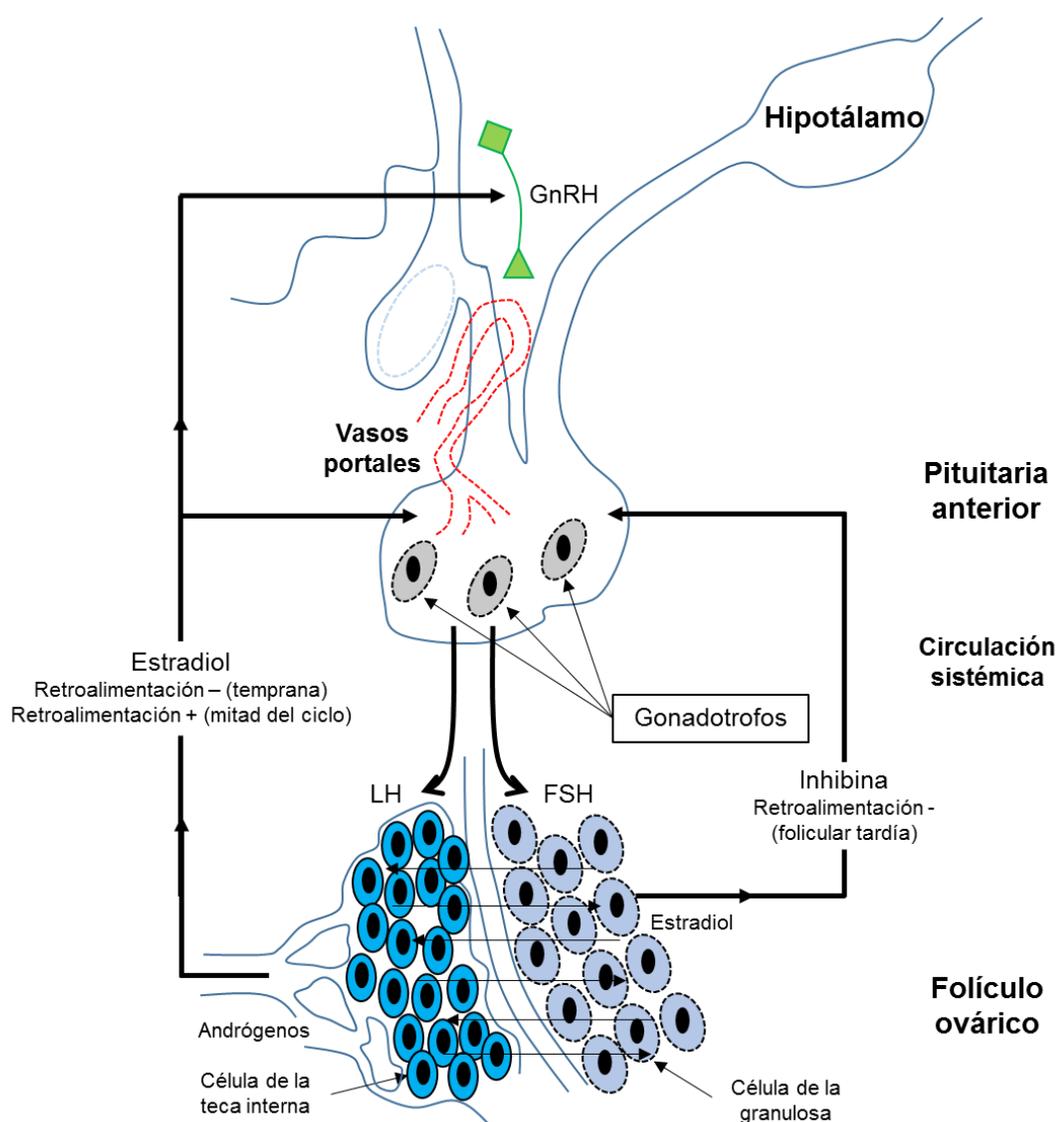


Figura 4. Interacción hipotálamo-hipófisis-ovario durante la fase folicular del ciclo estral en la perra, modificado de Linde-Forsberg (2001).

El patrón secretor de LH en estro se caracteriza por aumentos frecuentes de corta duración, a diferencia de las otras especies de mamíferos, la duración del aumento de LH en la perra es relativamente larga, con un rango de 1 a 5 días. Es posible emplear los niveles de LH como la técnica ideal para determinar con precisión el período de ovulación, ya que el pico de LH induce la ovulación y, por lo tanto, generalmente se declara como el "Día cero" del ciclo sexual de la perra. Al comienzo del proestro, la concentración basal de FSH en plasma es elevada,

pero se vuelve relativamente baja durante la progresión de la fase folicular. Concurrente o ligeramente anterior al pico de LH, se produce un aumento preovulatorio en FSH que dura aproximadamente tres veces más que el pico de LH preovulatorio. Durante el proestro, a medida que los folículos terciarios se desarrollan dentro de los ovarios, producen estradiol, lo que lleva a niveles plasmáticos máximos en el proestro tardío. Sin embargo, estos niveles máximos de estradiol difieren considerablemente entre los ciclos de celo (entre perra y perra), tan pronto como se produce el aumento de LH, se produce una disminución en la concentración plasmática de estradiol 17β , los valores basales ocurren alrededor de 80 h después del pico de LH (Haşegan *et al.*, 2012).

Durante el proestro, las concentraciones de P4 en plasma permanecen bajas inicialmente, pero fluctúan. Al comienzo de la oleada de LH preovulatoria, las células de la granulosa comienzan a luteinizarse y secretar P4. La relación temporal exacta entre el aumento inicial en la concentración de P4 en plasma y el aumento de LH preovulatorio es incierta. De hecho, el aumento inicial en las concentraciones de P4 puede ocurrir justo antes, concomitantemente o justo después del inicio de la oleada de LH, la concentración de P4 en plasma puede mantenerse en el mismo nivel durante 3 a 4 días antes de volver a aumentar. Típicamente en el momento del aumento de LH o al día siguiente, se observa que la concentración de P4 es de 2.0 ng/mL. Durante el metaestro, las concentraciones plasmáticas de P4 son altas y por lo general, se estancan a los 10 a 30 días después de la ovulación. En las perras no preñadas, la secreción de progesterona disminuye lentamente y alcanza un nivel basal aproximadamente 75 días después del inicio de la fase lútea (Haşegan *et al.*, 2012). En la Figura 5 se puede observar el comportamiento de algunas hormonas durante el ciclo estral de la perra.

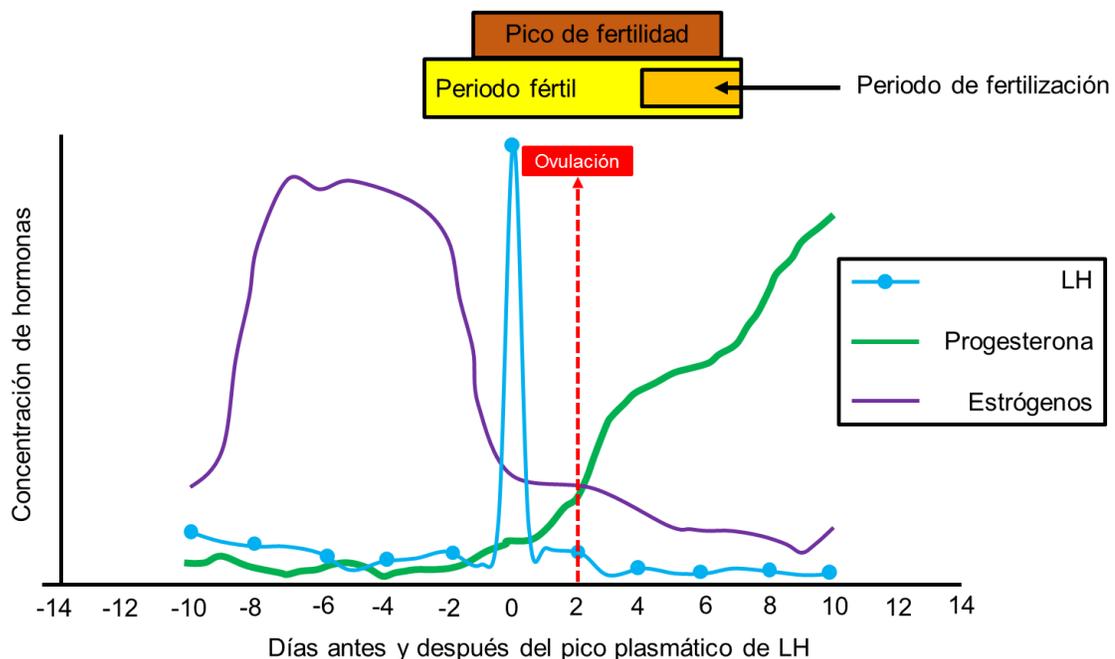


Figura 5. Cambios en las concentraciones sanguíneas de progesterona, estrógeno y hormona luteinizante, en relación con la ovulación, y los períodos fértiles y de fertilización de la perra, modificado de Linde-Forsberg (2001).

Gestación

En primera instancia, los ovocitos se ovulan en la etapa de vesícula germinal y requieren de 48-72 h adicionales en el oviducto para reanudar la meiosis y convertirse en competentes para la fertilización (Nagashima *et al.*, 2016). Una vez que se realiza la fertilización, el desarrollo prenatal se divide en tres períodos: óvulo, embrión y feto (Figura 6). El período del óvulo se caracteriza por un blastocisto, que está libre en el tubo uterino y migra al útero. Después de la fertilización del óvulo en el tubo uterino, el cigoto comienza a dividirse rápidamente. El período del embrión comienza con la implantación del blastocisto y termina con la finalización de la organogénesis. Durante la gastrulación o formación de la capa germinal la blástula de una sola capa se convierte en una estructura trilaminar que consiste en una capa ectodérmica, una mesodérmica y una capa endodérmica. El ectodermo se diferencia en epidermis y tejido neural, el endodermo forma el revestimiento de los tractos gastrointestinal y respiratorio,

y desde la capa mesodérmica media se forman el sistema esquelético, muscular urogenital, circulatorio y de soporte. Los órganos y tejidos de importancia reproductiva (glándulas mamarias, hipotálamo, lóbulos pituitarios, pene, vagina y clítoris) se derivan del ectodermo. Las gónadas, útero, cuello uterino, vagina craneal, epidídimo y glándulas sexuales accesorias se derivan del mesodermo. El embrión se desarrolla en una secuencia cefalocaudal, que comienza con los pliegues de la cabeza, luego el cierre del tubo neural, seguido de aparición de fisuras branquiales, placa ocular, masa cardíaca y crecimiento de las yemas de las extremidades. Durante esta etapa, las únicas características distinguibles por ultrasonografía son el movimiento el latido del corazón y el área anecoica en la cabeza. Por último, en el período del feto es el tiempo durante el cual aparecen los rasgos característicos y se produce un rápido crecimiento (Pretzer, 2008).

Ivanova y Georgiev (2018), mencionan que la fisiología de la gestación canina es un evento de características muy variadas. La duración de la gestación en las perras es relativamente consistente cuando se mide desde el día de la ovulación, pero es muy variable cuando se mide desde el día de la reproducción. En la gran mayoría de las perras, el parto ocurre entre los 64-66 días después de la oleada ovulatoria de la LH. Esta última representa la liberación aguda de LH de la hipófisis en el proestro tardío o en el estro temprano. La oleada de LH desencadena el evento de ovulación y, dado que el día del aumento de LH se puede medir o estimar con una precisión razonable, los eventos de tiempo de ese día y su uso como punto de referencia (Día 0) pueden ser útiles. En contraste, al utilizar el día del apareamiento como punto de referencia, como se observa en los casos de un solo apareamiento o inseminación, el parto puede ocurrir desde los 56 y hasta 68 días después. De manera similar, se puede encontrar una gran variación en la duración aparente de la gestación cuando se cuenta desde el primero de los apareamientos múltiples o el último de los apareamientos múltiples, los extremos encontrados difieren en dos semanas (Concannon, 2000).

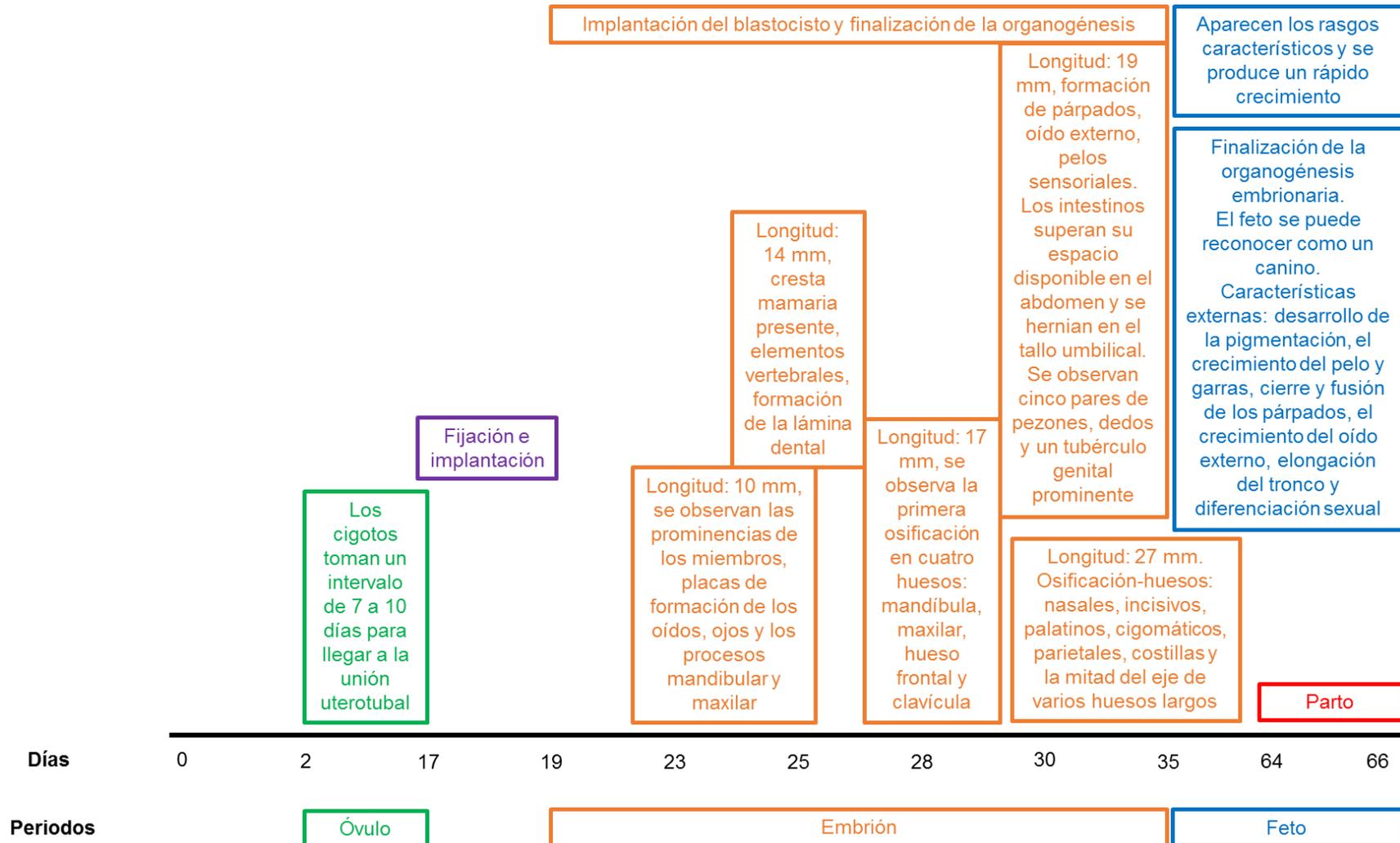


Figura 6. Secuencia del desarrollo prenatal, adaptado de Pretzer (2008).

En la perra, las concentraciones séricas de progesterona no son confiables para el diagnóstico de gestación. Esto se debe a la prolongación de las fases lúteas, independientemente del embarazo, que dan como resultado concentraciones elevadas de progesterona en circulación. Las concentraciones de progesterona también aumentan con el embarazo, pero se metabolizan rápidamente por la placenta, lo que da lugar a concentraciones similares de progesterona en circulación como en las perras no gestantes (Lamm y Maklaski, 2012). El ultrasonido es una de las formas más sensibles y confiables de detección de gestación (Figura 7). El diagnóstico debe intentarse alrededor de 25 a 30 días después del aumento de LH. Las estructuras fetales más pequeñas se hacen evidentes entre 17-20 días después del aumento de LH (Aissi, 2008).



Figura 7. Diagnóstico de gestación de una perra Bulldog Inglés de 2.5 años. Tomado de Sanchez *et al.*, (2010).

Es recomendable realizar un seguimiento durante la gestación, pero se recomienda específicamente en los casos en los que se haya elegido parto por cesárea. Dentro de los factores esenciales en los que se requiere un monitoreo se incluye a perras con un embarazo único, animales de raza gigante con camadas pequeñas, perras con camadas grandes donde existe preocupación por

fatiga uterina o inercia uterina secundaria, hembras con antecedentes de distocia; además de pacientes con gestación de alto riesgo que incluyen procesos tales como diabetes mellitus gestacional, toxemia del embarazo o aquellos que han entrado en trabajo de parto prematuro que ha sido interrumpido con agentes tocolíticos como la progesterona o la terbutalina, y deben someterse a una monitorización hormonal y ecográfica, con el objetivo es apoyar la gestación hasta el punto más temprano en que los neonatos puedan sobrevivir en un ambiente extrauterino sin comprometer la salud de la perra más allá de la recuperación (Lamm y Maklosky, 2012).

Parto

Hacia el final de la gestación, hay una caída de 1 °C en la temperatura rectal, por lo general unas 24 h antes del comienzo de los eventos que conducen al parto, el cual se produce en tres etapas. La primera etapa consiste en contracciones uterinas regulares y progresivas que duran entre 10-24 h y culminan en dilatación cervical. Mmomento en el que la perra puede observarse inquieta y solitaria, puede perder el apetito, ocurrir vómito y manifestar el comportamiento de anidación. La etapa dos consiste en contracciones musculares abdominales visibles para expulsar a los fetos dentro de las 4 h durante las cuales la perra está en cuclillas o acostada. Se considera una emergencia veterinaria si la perra no expulsa y a sus cachorros dentro de las 2 h posteriores al inicio de esta etapa y puede haber un descanso. Después del nacimiento del primer cachorro puede haber otro reposo, pero si su período dura más de 4 h sin que nazca otro cachorro, se necesita asistencia veterinaria. La tercera etapa del parto se define como la entrega de la placenta, que puede estar adherida al cachorro, o puede ser posterior al parto. Esto ocurre normalmente de 5-10 minutos después del nacimiento del cachorro. Si se entregan varios cachorros en sucesión rápida, se pueden administrar varias placentas al mismo tiempo. Las perras normalmente se alternan entre las etapas 2 y 3 hasta que se completa el parto de todos los fetos y la placenta (Ajala *et al.*, 2014).

Inseminación Artificial (IA)

De las técnicas de reproducción asistida empleadas en la actualidad, la IA es el primer y más importante medio para lograr el mejoramiento genético (Thomassen y Farstad, 2009). Este procedimiento, consiste en recolectar semen de machos y usarlo para impregnar hembras. El éxito y la popularidad de esta técnica son el resultado del establecimiento de métodos para identificar a los machos con el mérito genético más alto y de los criterios desarrollados para la caracterización del semen. Por lo tanto, los donantes de semen se seleccionan de machos clasificados como meritorios sobre la base de una combinación de parámetros para las pruebas de progenie. Por otra parte, el método de procesamiento del semen (fresco, refrigerado o congelado) y el sitio de depósito del semen (vaginal, cervical o intrauterino) dependen de la situación específica de cada especie animal (Basrur y King, 2005).

En perras, se emplean principalmente cuatro técnicas para la IA. El semen se puede depositar profundamente en la vagina o en el útero, ya sea por cateterización transcervical o por cirugía, y finalmente por IA intratubal, que también requiere cirugía (Makloski, 2012). La IA vaginal se puede realizar utilizando un catéter de plástico simple al cual se le adjunta una jeringa de plástico desechable simple que contiene el semen, o pueden emplearse catéteres que pueden obtenerse con un proveedor comercial. La IA intrauterina, tiene buenos resultados independientemente del tipo de semen utilizado (congelado o descongelado), el cual se deposita en el útero. La IA transcervical puede realizarse mediante el empleo de un equipo que consiste en un catéter de acero inoxidable y un tubo guía de plástico. El tubo guía se utiliza para proteger y estabilizar el catéter y para estirar la vagina y proteger la mucosa vaginal contra daños durante la inserción del catéter. El cuello uterino se fija a través de la palpación abdominal y el semen se deposita por inseminación intrauterina mediante la inserción del catéter a través del cuello uterino. Por último, se puede

emplar la IA quirúrgica y laparoscópica, procedimiento que asegura el depósito adecuado del semen dentro del útero (Thomassen y Farstad, 2009). En el Cuadro 2, se resumen las características de algunos estudios en los que se emplean distintos métodos de inseminación artificial.

Cuadro 2. Particularidades de estudios donde se aplican las técnicas de IA.

n*	Semen	Procedimiento	Observaciones	Referencia
21	Congelado	Intratubal	Entre los animales preñados se abortó el 33,3%	Tsutsui <i>et al.</i> (2003)
1	Congelado	Intravaginal	Se produjo parto normal a los 63 días posterior a la inseminación	Klinc <i>et al.</i> (2005)
24	Congelado	Intravaginal	Los porcentajes de gestación, para las perras inseminadas fueron del 83% y 60%, respectivamente	Nöthling <i>et al.</i> (2005)
526	Congelado	Intravaginal vs intrauterino	El porcentaje de partos fue mayor con la inseminación intrauterina que con la inseminación intravaginal	Thomassen <i>et al.</i> (2006)
30	Congelado	Intratubal vs intrauterina	Los porcentajes de partos fueron significativamente más altas en los grupos con inseminación intrauterina que en los grupos con inseminación intratubal	Jin-Kim <i>et al.</i> (2007)
10	Fresco	Transcervical	Se obtuvo un 90% de partos del total de perras inseminadas	Macedo <i>et al.</i> (2012)
115	Congelado	Laparotomía y transcervical	De las 13 perras del grupo 1, confirmadas como gestantes mediante ultrasonido, una no llevó su gestación a término, mientras que de las 39 perras confirmadas como gestantes en el grupo 2, seis no llevaron su gestación a término	Mason y Rous (2014)
33	Congelado	Transvaginal	En este estudio, el 88% de las perras tuvo gestación a término	Ohtaki <i>et al.</i> (2014)
1203	Fresco y congelado	Intrauterina, transcervical y vaginal	El porcentaje de partos fue significativamente menor en las perras inseminadas con semen congelado y descongelado en comparación con las perras en las que se empleó semen fresco.	Hollinshead y Hanlon (2017)
20	Congelado	Transcervical	La incapacidad para cateterizar el cuello uterino en algunas perras también pudo ser un factor para el nulo porcentaje de concepción después de la IA	Sathiamoorthy <i>et al.</i> (2017)

*Cantidad de perras inseminadas

NOTA: En todos los casos, para considerar que hubo una gestación exitosa se consideró el total de partos.

Manejo hormonal del desempeño reproductivo en perras

Se han estudiado diversos métodos potenciales, usando varios compuestos tales como los agonistas de la dopamina, entre los que encontramos a la bromocriptina (Sirivaidyapong, 2011), cabergolina (Shinde *et al.*, 2014), los agonistas de la GnRH como la desdorelina (Lanna *et al.*, 2010), estradiol, PGF2 α (Rodas-Ruiz *et al.*, 2015), FSH (Schäfer-Somi, 2015), eCG y GnRH (Rezende *et al.*, 2018). En algunos casos no se han logrado concepciones satisfactorias; no obstante, se han observado efectos secundarios desagradables, como anorexia y vómitos. Se sabe que el uso del agonista de la GnRH produce un desarrollo folicular suficiente para producir proestro, estro y ovulación espontánea, debido a que su proceso es similar a la estimulación natural de la glándula pituitaria, provocando la liberación de FSH y LH, dando como resultado la gestación en cinco de ocho perras inducidas por la implantación en la mucosa vulvar. También se ha observado que la administración del agonista de la GnRH, produce altos porcentajes de inducción del proestro, ovulación espontánea y gestación; sin embargo, la inducción de estro fértil en las perras sigue siendo un reto (Sirivaidyapong, 2011) debido a características que difieren de las de otras especies (Rezende *et al.*, 2018), lo que hace necesario realizar más investigaciones con otras opciones para mejorar el desempeño reproductivo.

Oxitocina: su papel en la reproducción y en la IA

La oxitocina fue descubierta en 1906 el fisiólogo y farmacólogo Henry Dale, quien observó que los extractos de la glándula pituitaria posterior humana causaban contracciones en el útero de una gata embarazada (Arrowsmith y Wray, 2014), este personaje acuñó el nombre oxitocina de las palabras del griego ὄξύς oxys "rápido" y τόκος tokos "nacimiento" que significa "nacimiento rápido" (Viero *et al.*, 2010).

Químicamente, la oxitocina es una hormona neurohipofisaria peptídica que consta de nueve aminoácidos, es secretada por las células neurosecretoras meganocelulares en los núcleos supraópticos y paraventriculares del hipotálamo, la cual se almacena en la hipófisis posterior hasta su liberación en el torrente sanguíneo. La secreción de oxitocina por las terminaciones nerviosas neurosecretoras está regulada por la actividad eléctrica de las células de oxitocina en el hipotálamo, las cuales, al ser afectadas por el potencial de acción que se propaga por los axones a las terminaciones nerviosas de las vesículas que contienen oxitocina, liberan la hormona por exocitosis. Antes de la liberación de oxitocina, es necesario separarla de la neurofisina-I, mediante un proceso progresivo a través de la enzima peptidilglicina α -amidante monooxigenasa, la cual, mediante un proceso de hidrólisis, liberan el nanopéptido de oxitocina activo (Assad *et al.*, 2016).

La oxitocina también es producida por fuentes no neuronales. El desarrollo de técnicas para identificar las transcripciones del ARNm de oxitocina y sus receptores ha proporcionado pruebas concluyentes para respaldar la síntesis local de oxitocina dentro del tracto reproductivo. En el caso de las hembras, la oxitocina no solo se sintetiza en los órganos del tracto reproductivo, incluido el oviducto y el útero, sino que también se sintetiza en el cuerpo lúteo en el caso de las búfalas, las vacas y las yeguas, lo que sugiere un papel paracrino cerca de los sitios de producción (Assad *et al.*, 2016).

Dentro de las acciones periféricas de la oxitocina en la hembra, se reportan sus efectos sobre reflejo de bajada de la leche en hembras lactantes, parto, involución uterina, proliferación celular. La relación entre la oxitocina y la respuesta sexual no está clara, pero se especula que los efectos de la oxitocina sobre la contractibilidad muscular pueden facilitar el transporte de espermatozoides y óvulos mejorando el desempeño reproductivo (Assad *et al.*, 2016). Generalmente, la hormona se administra a una dosis de 10 U por vía intravenosa o 20-40 U por vía intramuscular. Cuando se administra por vía intravenosa, las

contracciones uterinas se observan después un minuto, mientras que por vía intramuscular entre 3-5 minutos, alcanzando un estado estable después de 40 minutos. El metabolismo se produce rápidamente a través del hígado y el plasma por la enzima oxitocinasa, con una vida media de 1 a 5 minutos (Kabilan, 2014).

La investigación sobre la oxitocina en especies de animales domesticos tales: como perros, cerdos, vacas, ovejas está aumentando rápidamente; sin embargo, la mayoría de los experimentos actuales se basan en las implicaciones directas sobre el comportamiento social y bienestar animal, debido a su fuerte asociación con el estado mental (Chen y Sato, 2017; Rault *et al.*, 2017). En relación, a los aspectos reproductivos que involucran a la hormona, se sabe que es el agente uterotónico endógeno más potente y es capaz de estimular las contracciones uterinas cuando se administra por infusión intravenosa a dosis de 1 a 2 mU/min., donde la frecuencia y amplitud de las contracciones uterinas inducidas son idénticas a las que ocurren durante el parto espontáneo (Asgari-Safdar y Moradi-Kor, 2014).

Existen diversos estudios en los que se evalúa la efectividad de la oxitocina con la producción láctea (Marnet y McKusick, 2001; Tančin y Bruckmaier, 2001), así como su asociación con el proceso del parto (Taverne y van der Weijden, 2008), mientras que también ha sido utilizada en la búsqueda de mejorar los parámetros reproductivos tales como el porcentaje de gestación en vacas (Gümen *et al.*, 2011; Romo-Valdez *et al.*, 2017). Además, se ha probado que la adición de oxitocina mejora el transporte de espermatozoides al oviducto y tasas de concepción (Okazaki *et al.*, 2014).

Se sabe que el transporte de espermatozoides dentro del tracto reproductivo de la perra es rápido y está influenciado por el método de deposición de semen (apareamiento natural o inseminación artificial) y por el momento de reproducción en relación con el día de la ovulación (Rijsselaere *et al.*, 2014). Por otra parte, durante el ciclo estral normal, la oxitocina puede ser responsable del transporte

de espermatozoides u ovocitos, o del movimiento de productos secretores por la contracción del músculo liso uterino (Prapaiwan *et al.*, 2015).

MATERIALES Y MÉTODOS

DetECCIÓN DEL ESTRO

Esta investigación se llevó a cabo en una unidad de reproducción comercial en el norte de México. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de conformidad con el comité de ética de la Escuela de Veterinaria de la Universidad Agraria Autónoma Antonio Narro. En el estudio se incluyeron setenta y ocho perras Bulldog inglés normales y saludables. Los animales tenían de uno a tres años de edad con al menos un parto previo y pesaban entre 15.6 y 29.5 kg (media \pm desviación estándar, 22.1 ± 3.7). Se consideró que todas las perras estaban en estro, debido a que se observó inflamación de la vulva, abundancia de células superficiales anucleadas en sus frotis vaginales ($> 70\%$), descargas vaginales serosanguinolentas, niveles séricos de progesterona (P4) > 12 ng / mL y bandereo del rabo.

Cada frotis vaginal se evaluó bajo microscopía óptica (magnificación de 200 x) para el tipo de células epiteliales vaginales presentes con el fin de determinar la etapa del ciclo del estro. El estro se definió citológicamente cuando el predominio de las células superficiales estaba presente y, en la mayoría de los casos, se había sometido a una cornificación completa. Para la citología vaginal (vestíbulo), se utilizaron tres aplicadores esterilizados con una punta de algodón de 15 cm, los cuales se introducen uno por uno, deslizándolo suavemente sobre la superficie de la mucosa vaginal en un ángulo de aproximado de 45 grados. Una vez recogidas las células, se colocaron en un portaobjetos de vidrio haciendo rodar ligeramente el hisopo de algodón. Para la evaluación microscópica, las células recogidas se tiñeron con tinción Diff-Quik. Además, se evaluaron las concentraciones séricas de P4 cada tercer día. Se recolectaron muestras de sangre de 10 mL cada dos días (entre las 08.00 y las 09.00 h) de cada perra mediante venopunción yugular, el criterio para comenzar la colecta de sangre fue la observación evidente de la vulva inflamada y se continuaron hasta obtener concentraciones séricas de P4 ≥ 8.0 ng/mL. La sangre se extrajo en tubos para

suero al vacío y se dejó coagular a 25 °C durante 30 minutos y luego se centrifugó durante 5 minutos a 1500 g. Las muestras de suero se analizaron por quimioluminiscencia con el uso del kit P4 II (Roche Diagnostics, Meylan, Francia). El día en que la concentración de suero P4 alcanzó 4.8 a 7.2 ng/mL se consideró como el día de la ovulación. La IA se realizó aproximadamente tres días después del día de ovulación previsto a partir del nivel de P4 en suero periférico (Hollinshead y Hanlon, 2019).

Procedimiento de la inseminación artificial

Previo a la cirugía, cada perra se sometió a un examen clínico y una evaluación preanestésica, utilizando solo las hembras clasificadas en la categoría de riesgo anestésico I de acuerdo a los lineamientos de la Sociedad Americana de Anestesiólogos (ASA, por sus siglas en inglés). La IA se realizó bajo anestesia general y en decúbito dorsal. Se afeitó el abdomen ventral y, después de la preparación quirúrgica de rutina, se realizó una incisión de 4-6 cm en la línea alba entre el pubis y el ombligo. El útero se sujetó y se elevó a través de la incisión y posteriormente se insertó un catéter de 24 G x ¾ pulgadas, que se acopló a una jeringa que contenía el semen (300 a 2500 x 10⁶ células espermáticas totales). Este se depositó lentamente en el lumen del cuerpo uterino en un ángulo de 45° con el bisel de la aguja hacia arriba. Después de retirar la aguja, los hisopos quirúrgicos humedecidos (solución salina) se mantuvieron sobre el lugar de la inyección durante un minuto para evitar el secado. Se usaron pinzas de lengua estériles para comprimir las paredes laterales del cuello uterino con la finalidad de prevenir el reflujo del semen hacia la vagina. Finalmente, el útero se colocó de nuevo en su sitio y el abdomen se cerró con métodos rutinarios de cirugía abdominal. Para prevenir el reflujo de semen, las perras se colocaron con los cuartos traseros elevados mientras se recuperaban de la anestesia. Durante la IA, algunas de las perras recibieron 20 UI de oxitocina directamente en el lumen del útero. Se registró la ocurrencia de partos luego de la inseminación quirúrgica y el número de crías producidas por perra incluyó aquellas que murieron en el momento inmediato del parto.

Colecta y evaluación de semen

Para la recolección de semen se empleó una perra en estro y se indujo la eyaculación del perro mediante la manipulación manual del pene. Se recolectó el semen de 10 perros diferentes, en tubos de plástico de 15 mL unido a un cono de goma de látex blando y esterilizado. El semen recolectado (mezcla de tres fracciones) se evaluó para determinar la motilidad y concentración del esperma. La motilidad de los espermatozoides (porcentaje de espermatozoides móviles) se evaluó colocando una gota de semen en un portaobjetos de microscopio calentado y se observó en un microscopio óptico (100x). La concentración se midió llenando una pipeta capilar con 1,98 mL de diluyente a base de formaldehído y semen (20 microlitros) y luego inundando una cámara de hemocitómetro (0,100 mm) con la mezcla de semen / diluyente. En el estudio solo se utilizaron muestras que presentaron un volumen $\geq 1,5$ mL, una concentración $> 125 \times 10^6$ espermatozoides / mL, y motilidad espermática $\geq 70\%$.

Diagnóstico de la gestación por ultrasonido

El diagnóstico de gestación se realizó entre los días 23 y 25 posteriores a la IA. Las hembras fueron examinadas para determinar el latido del corazón de los fetos, mientras la hembra estaba de pie con la sonda colocada en el abdomen ventral o latera, para este procedimiento se utilizó un ultrasonido en modo B equipado con una sonda de 7.5 MHz (LOGIQ 7; GE Medical System, EE. UU.).

Parición de los cachorros y cuidados neonatales

El procedimiento de cesárea se programó entre los días 56 a 61 y se utilizó el método quirúrgico estándar para este proceso (Batista *et al.*, 2014). Inmediatamente después del parto uterino, las crías se secaron suavemente con una toalla a temperatura ambiente (30–35 ° C). Sus vías respiratorias superiores (boca y nariz) se limpiaron a fondo; se retiraron las membranas fetales y se prenzó el cordón umbilical con ayuda de unas pinzas. Luego, los cachorros fueron

evaluados para detectar deformidades físicas y los cachorros con defectos de nacimiento no recibieron atención neonatal continua. Las dos medidas principales del desempeño reproductivo (variables dependientes) de interés fueron el porcentaje de parto y el tamaño de la camada. El porcentaje de partos se definió como el número total de perras que parieron al menos un cachorro (vivo o muerto) dividido por el número total de perras inseminadas x 100. El tamaño de la camada se definió como el número total de cachorros nacidos en cada camada (vivo o muerto). El tamaño de la camada se registró solo en 50 perras. Se registraron todas las malformaciones presentes en cachorros, así como el número de cachorros muertos.

Análisis estadístico

La unidad de análisis fue la perra; ninguna de las perras contribuyó a más de un estro. Se evaluaron los siguientes determinantes potenciales del parto y el tamaño de la camada: deposición de oxitocina en el útero en AI (sí o no), peso corporal de perra en la AI (mayor o menor que 23 kg), porcentaje de diferentes categorías de células epiteliales vaginales en AI (dicotomizado) variables; se utilizaron medias porcentuales como punto de corte), concentraciones séricas de P4 en la IA (mayor o menor que 14 ng / mL), volumen de semen (mayor o menor que 4 mL / inseminación) y número total de células espermáticas inseminadas (mayor o menor que 1500 x 10⁶ células espermáticas). Para analizar los factores que contribuyen al porcentaje de parto (rasgo binario), se utilizó el procedimiento HPGENSELECT de SAS, aplicando un procedimiento de regresión para eliminar todas las variables no significativas. Además, se empleó un enlace de distribución binaria.

El modelo completo preliminar incluyó las variables explicativas descritas anteriormente. No se encontraron interacciones significativas entre las fuentes de variación; por lo tanto, el modelo final incluyó sólo los efectos principales. Se obtuvieron estadísticas descriptivas con el procedimiento FREQ de SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Este procedimiento también se utilizó para calcular los

intervalos de confianza del 95% para los porcentajes de parto. Los datos del tamaño de la camada se analizaron para determinar su distribución gaussiana y los coeficientes de asimetría y curtosis (PROC UNIVARIATE en SAS) para medir la asimetría de distribución y el punto máximo. Esta variable no estaba normalmente distribuida; por lo tanto, el tamaño de la camada se analizó con la prueba de Wilcoxon (PROC NPAR1WAY de SAS) para probar la hipótesis nula de que no hubo diferencias en el tamaño de la camada entre los grupos.

RESULTADOS

De las 78 perras que fueron inseminadas quirúrgicamente con semen fresco y sin diluir, 56 (71.8%) parieron camadas con un tamaño promedio de 3.04 ± 1.76 crías con una gran variación entre las perras. El parto de cachorros muertos fue de 7.23%, la mayoría de ellos asociados con anasarca. El paladar hendido se presentó en el 2.6% de los cachorros, mientras que el 8,6% de los cachorros presentaron anasarca. Los cachorros con hernias inguinales o umbilicales comprendieron el 4.6% de todos los animales paridos. Se detectó piometra en al menos uno de los cuernos uterinos en el 7.1% de las perras durante el procedimiento de cesárea.

La aplicación de oxitocina en el útero en la IA no afectó el porcentaje de parto ni el tamaño de la camada ($P > 0.1$). El porcentaje de crías obtenida con perras que pesaban <23 kg, fue menor ($P < 0.05$) que las perras con peso corporal (PC) > 23 kg (Cuadro 3). Las perras inseminadas con $> 45\%$ de células escamosas (cornificadas) en los frotis vaginales fueron significativamente más propensas ($P < 0.05$) a parir que las inseminadas con $<45\%$ de células escamosas. Se observaron menos partos ($P < 0.05$) en las perras en las que se depositaron <4 mL de semen que en las perras inseminadas con ≥ 4 mL de semen. Las células de esperma totales depositadas en el útero no afectaron el porcentaje de parto y el tamaño de la camada ($P > 0.1$). Las perras inseminadas con concentraciones séricas de P4 > 14 ng / mL tuvieron la misma probabilidad de quedar gestantes que aquellas perras inseminadas con concentraciones séricas de P4 < 14 ng / mL. La única variable asociada con el tamaño de la camada fue el PC (Cuadro 4); cuanto más pesadas son las perras al momento de la AI, mayor es el tamaño de la camada.

Cuadro 3. Poceraje de partos en función de los potenciales determinantes del parto en 78 inseminaciones intrauterinas quirúrgicas en perras Bulldog inglés.

Variabes	Porcentage	95% IC
Aplicación de oxitocina en el útero		
Si	42.1 (8/19)	20.2 – 66.5
No	72.9 (43/59)	59.7 – 83.6
Peso corporal (kg)		
< 23	63.8 (30/47) ^a	48.5 – 77.3
> 23	83.9 (26/31) ^b	66.3 – 94.6
Células intermedias pequeñas (%)		
< 3	69.4 (34/49)	54.6 – 81.8
> 3	75.9 (22/29)	56.5 – 89.7
Células intermedias grandes (%)		
< 12	66.7 (30/45)	51.1 – 80.0
> 12	78.8 (26/33)	61.1 – 91.0
Células superficiales parcialmente cornificadas (%)		
< 40	73.5 (25/34)	55.6 – 87.1
> 40	70.5 (31/44)	54.8 – 83.2
Células superficiales completamente cornificadas (%)		
> 45	82.6 (38/46) ^a	68.6 – 92.2
< 45	56.3 (18/32) ^b	37.3 – 73.6
Progesterona sérica (ng/mL)		
< 14	76.5 (26/34)	58.8 – 89.3
> 14	68.2 (30/44)	52.4 – 81.4
Volúmen de semen (mL)		
< 4	54.3 (19/35) ^A	36.7 – 71.1
> 4	86.1 (37/43) ^B	72.1 – 94.7
Total de células de esperma aplicadas en el útero (x 10 ⁶)		
< 1500	75.6 (31/41)	59.7 – 87.6
> 1500	67.6 (25/37)	50.2 – 82.0

IC, intervalo de confianza

^{ab}En columnas, las medias con diferente superíndice difieren (P < 0.05).

^{AB}En columnas, las medias con diferente superíndice difieren (P < 0.01).

Cuadro 4. Tamaño de la camada en función de los determinantes potenciales de crías múltiples en 50 inseminaciones intrauterinas quirúrgicas en perras Bulldog inglés.

Variables	n	Tamaño de camada	Rango	95% IC
Aplicación de oxitocina en el útero				
Si	39	2.75 ± 1.50	1 – 4	0.36 – 5.14
No	11	2.97 ± 1.63	1 – 6	2.44 – 3.50
Peso corporal (kg)				
< 23	25	2.30 ± 1.46 ^a	1 – 6	1.75 – 2.96
> 23	25	3.72 ± 1.79 ^b	1 – 8	2.98 – 4.46
Células intermedias pequeñas (%)				
< 3	30	3.00 ± 1.83	1 – 8	2.31 – 3.68
> 3	20	3.10 ± 1.68	1 – 6	2.31 – 3.89
Células intermedias grandes (%)				
< 12	24	3.04 ± 1.94	1 – 8	2.22 – 3.86
> 12	26	3.03 ± 1.61	1 – 6	2.38 – 3.69
Células superficiales parcialmente cornificadas (%)				
< 40	28	3.00 ± 1.92	1 – 8	2.14 – 3.85
> 40	22	3.07 ± 1.65	1 – 6	2.43 – 3.71
Células superficiales completamente cornificadas (%)				
< 35	13	3.00 ± 1.76	1 – 8	2.41 – 3.59
> 35	37	3.15 ± 1.82	1 – 6	2.05 – 4.25
Progesterona sérica (ng/mL)				
< 14	23	3.04 ± 1.92	1 – 8	2.21 – 3.87
> 14	27	3.05 ± 1.65	1 – 6	2.38 – 3.69
Volúmen de semen (mL)				
< 4	23	3.23 ± 2.07	1 – 8	2.16 – 4.30
> 4	27	2.93 ± 1.59	1 – 8	2.37 – 3.50
Total de células de esperma aplicadas en el útero (x 10 ⁶)				
< 1500	28	3.11 ± 1.93	1 – 8	2.35 – 3.86
> 1500	22	2.95 ± 1.55	1 – 5	2.26 – 3.64

IC, intervalo de confianza

^{ab}En columnas, las medias con diferente superíndice difieren (P < 0.01).

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que se puede esperar un alto porcentaje de partos después de la IA intrauterina en las perras Bulldog inglés, con una dosis única de semen fresco que contiene un número adecuado de espermatozoides móviles progresivamente. El porcentaje de partos del presente estudio es muy cercana al 73.1% obtenido por Burgess *et al.* (2012) después de las inseminaciones intrauterinas asistidas por celiotomía en una gran variedad de razas de perros. Específicamente en perras Bulldog inglés en el estudio mencionado anteriormente, el porcentaje de partos obtenida fue de 87.5%, que es 18 puntos porcentuales más alto que el valor obtenido en el presente estudio. Otros estudios que utilizan la deposición de semen intrauterino quirúrgico han informado porcentajes de parto de entre el 46% y el 100% (Tsutsui *et al.*, 1989; Silva *et al.*, 1995; Ogasa *et al.*, 2011). Sin embargo, las comparaciones entre los estudios anteriores que utilizan la inseminación intrauterina bajo anestesia general son difíciles de comparar con el presente estudio, debido a la reducción en el número de perras y diferentes procedimientos utilizados. Otra variable de confusión es el uso de semen fresco, fresco, frío o congelado. A pesar de las limitaciones en la comparación de los estudios con IA intrauterina, el porcentaje de partos en el presente estudio es comparable o mejor a otros estudios en los se utilizó inseminación intrauterina (Linde-Forsberg *et al.*, 1999; Niżański, 2005).

En el presente estudio, las perras más pesadas presentaron un mayor porcentaje de partos que las perras más ligeras. Se ha observado que los animales con bajo peso tuvieron un menor porcentaje de gestación que las perras con puntaje de condición corporal ideal (Ortega-Pacheco *et al.*, 2007), aunque el bajo peso en las perras no es una limitación para el número de ovulaciones y los ciclos del estro normal en comparación con las perras de peso ideal (Lawler *et al.*, 1999; Ortega-Pacheco *et al.*, 2007). El hecho de que el porcentaje de reproducción y el peso corporal tienden a asociarse con los Bulldog inglés indica que, a su vez, se correlacionan con las diferencias entre la población en relación a la ingesta de nutrientes - energía y / o en la eficiencia de los procesos fisiológicos.

En el presente estudio, un mayor porcentaje de células superficiales y anucleares, completamente cornificadas en la vagina en la IA se relacionó con mayores porcentajes de parto. Durante el monitoreo de P4 en suero se observó que los niveles de esta hormona continuaron aumentando en todas las perras por encima de 5 ng / mL, lo que confirma la ovulación y la luteinización (Hollinshead y Hanlon, 2019). El hecho de que algunas perras tuvieran < 45% de células vaginales cornificadas y la aparición de células nucleadas redondas que indican el inicio del "vaciamiento epitelial vaginal" y las altas concentraciones séricas de P4 en la AI sugieren que algunas perras fueron sometidas a la AI cuando el diestrus se acercaba (Antonov, 2017) y, por lo tanto, probablemente no fueron inseminadas en el momento adecuado, resultando en una disminución del porcentaje de partos. Sin embargo, vale la pena mencionar que la confiabilidad de la citología vaginal para determinar el período de apareamiento óptimo es controvertida porque el apareamiento de acuerdo con los hallazgos citológicos daría como resultado que solo el 28% de las perras se aparearan en el momento adecuado (Hiemstra *et al.*, 2001). Además, la citología vaginal para estimar la etapa del ciclo reproductivo varía entre los técnicos (Moxon *et al.*, 2010) y los estudios (Groppetti *et al.*, 2015). Por lo tanto, parece que la infertilidad en la perra está altamente relacionada con prácticas de manejo de reproducción inapropiadas en lugar de una incapacidad para concebir o llevar una camada a término.

En el presente estudio, hubo una relación positiva entre el volumen de semen y los embarazos obtenidos. Por lo tanto, parece que los factores ligados al semen aumentan la probabilidad de una preñez exitosa en perras. Esto está respaldado por estudios que demuestran que la adición de suero seminal o factores seminales puede mejorar el éxito del embarazo en diferentes mamíferos (Bromfield, 2014). Durante décadas, se pensó que la única función del suero seminal era un medio de transporte para que las células espermáticas cruzaran el tracto reproductivo femenino y proporcionaran sustratos metabólicos para

sostener la viabilidad de los espermatozoides. Sin embargo, las evidencias sugieren que el suero seminal tiene un papel importante en la mejora del éxito temprano de la gestación, mediante la modulación de las adaptaciones celulares y moleculares del entorno uterino esencial para facilitar los resultados de una gestación exitosa (Bromfield, 2016). De acuerdo con nuestro resultado, se recomendaría un volumen de semen de al menos 4 mL por dosis para la inseminación intrauterina quirúrgica utilizando semen fresco no diluido.

El tamaño medio de la camada en este estudio fue de 3.04 (\pm 1.76 DE), lo cual no concuerda con lo observado por Burgess *et al.* (2012), quienes encontraron un promedio de 5.8 cachorros por camada para las perras Bulldog inglés. Así mismo, Wydooghe *et al.* (2013) registraron una media de 6.0 cachorros para esta raza, mientras que Borge *et al.* (2011) encontraron un tamaño promedio de camada de 5.4 cachorros (37 camadas) para el Bulldog Inglés. En este último estudio, el 8,2% de las crías neonatales tenían una patología fetal, principalmente palatosquisis y anasarca, una cifra muy similar a la observada en nuestro estudio. Se ha observado que tanto para la palatosquisis (Wydooghe *et al.*, 2013) como para las crías con anasarca (Hopper *et al.*, 2004) existe una predisposición familiar, ya que estas malformaciones ocurren cuando se utilizan ciertos perros machos. Sin embargo, esta visión no está del todo apoyada por el presente estudio porque las malformaciones observadas fueron altas a pesar de que se utilizó semen de 10 machos no relacionados. El bajo tamaño medio de la camada que se observó en el estudio se debió, en parte, a cuatro casos de piometra que coexisten con la gestación; en todos estos casos solo se obtuvo un cachorro.

En el presente estudio, las perras con mayor peso corporal tuvieron camadas más grandes, lo que está de acuerdo con las observaciones de otros investigadores (Thomassen *et al.*, 2006; Borge *et al.*, 2011; Burgess *et al.*, 2012), donde se documenta que el tamaño de la camada se ve afectado por el peso o tamaño de la perra. Se ha observado que las perras de tamaño mediano y grande tuvieron más ovulaciones que las de tamaño pequeño (Ortega-Pacheco *et al.*,

2007), aunque el tamaño de la camada no corresponde necesariamente al número de cuerpos lúteos debido a la mortalidad embrionaria (Ortega-Pacheco *et al.*, 2006). Estudios anteriores han demostrado una correlación entre la calidad del semen y el tamaño de la camada (Linde-Forsberg *et al.*, 1989; Hollinshead y Hanlon, 2019), con camadas más pequeñas en las que el semen utilizado es de calidad inferior, congelado / descongelado. Sin embargo, bajo las condiciones de este estudio donde el volumen de semen y el total de espermatozoides utilizados por inseminación eran mucho más altos que los publicados anteriormente, quedando claro que la calidad y cantidad de semen maximizaba el tamaño de la camada.

CONCLUSIONES

Los resultados de este ensayo clínico refuerzan la observación de que se puede esperar un porcentaje de parto aceptable después de la inseminación artificial intrauterina quirúrgica de la perra Bulldog inglés con semen fresco que contiene un número adecuado de espermatozoides móviles progresivamente. Además, estos hallazgos proporcionan evidencia de que los porcentajes de crianza y el tamaño de la camada mejoran con el peso corporal de las perras >23 kg. Es importante destacar que estos hallazgos indican que los porcentajes de crianza con inseminación intrauterina se maximizan con la aplicación de ≥ 4 mL de semen con más de 300×10^6 células espermáticas progresivamente móviles.

LITERATURA CITADA

- AISSI, A. 2008. Aspects of ultrasonographic diagnostics of pregnancy in bitches depending on the first mating. *Vet World*. 1(10): 293-295.
- AJALA, O.O., AJANI, O.S., LEIGH, O.O., OBUDU, C.E., AKIRINMADE, J.F., OLUSOJI M.J., EKANADE, O.A. 2014. Prolonged whelping in bitches. *SJVS*. 12(3): 1-4.
- ANTONOV, A.L. 2017. Application of exfoliative vaginal cytology in clinical canine reproduction – a review. *Bulgarian J Vet Med*. 20: 193-203.
- ARROWSMITH, S., WRAY, S. 2014. Oxytocin: its mechanism of action and receptor signalling in the myometrium. *J Neuroendocrinol*. 26(6):356-69.
- ASGARI-SAFDAR, AH., MORADI-KOR, N. 2014. Parturition mechanisms in ruminants: A complete overview. *Euro J Exp Bio*. 4(3): 211-218.
- ASPINALL, V. 2004. Anatomy and physiology of the dog and cat 10. The female reproductive system. *Vet Nurs J*. 19(5): 168-172.
- ASPINALL, V. 2011. Reproductive system of the dog and cat – Part 3. Reproductive physiology of the bitch. *Vet Nurs J*. 26(5): 153-157.
- ASSAD, N.I., PANDEY, A.K., SHARMA, L.M. 2016. Oxytocin, functions, uses and abuses: a brief review. *Theriogenology Insight*. 6(1): 1-17.
- BASRUR PK, KING WA. 2005. Genetics then and now: breeding the best and biotechnology. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*. 24(1): 31–49.
- BATISTA, M., MORENO, C., VILAR, J., GOLDING, M., BRITO, C., SANTANA, M, ALAMO, D. 2014. Neonatal viability evaluation by Apgar score in puppies delivered by cesarean section in two brachycephalic breeds (English and French bulldog). *Anim Reprod Sci*. 146: 218-226.
- BORGE, K.S., TONNESSEN, R., NODTVEDT, A., INDREBO, A. 2011. Litter size at birth in purebred dogs-A retrospective study of 224 breeds. *Theriogenology*. 75: 911-919.
- BROMFIELD, J.J. 2016. A role for Seminal serum in modulating pregnancy outcomes in domestic species. *Reproduction*. 152: 223-232.
- BROMFIELD, J.J. 2014. Seminal fluid and reproduction: Much more than previously thought. *J Assist Reprod Genet*. 31: 627-636.

- BURGESS, D., MITCHELL, K., THOMAS, P. 2012. Coeliotomy-assisted intrauterine insemination in dogs: A study of 238 inseminations. *Austral Vet J.* 90: 283-290.
- BUTINAR, J., MUJAGIĆ, E., GALAC, S. 2004. The oestrus cycle in the bitch: A review article. *Slov Vet Res.* 41 (1): 5-11.
- CHASTANT-MAILLARD, S., CHEBROUT, M., THOUMIRE, S., SAINT-DIZIER, M., CHODKIEWICZ, M., REYNAUD, K. 2010. Embryo biotechnology in the dog: a review. *Reprod Fertil Dev.* 22: 1049–1056.
- CHEN, S., SATO, S. 2017. Role of oxytocin in improving the welfare of farm animals — A review. *Asian-Australas J Anim Sci.* 30(4): 449-454.
- CHOUDHARY, K.K., KAVYA, K.M., JEROME, A., SHARMA, R.K. 2016. Advances in reproductive biotechnologies. *Vet World.* 9(4): 388-395.
- CONCANNON, P.W. 2000. Canine pregnancy: Predicting parturition and timing events of gestation. <http://people.upei.ca/lofstedt/public/chromosome.puzzle/images%20for%20chromosomes/private/pdf.files.not.in.courses/pregnacy.concannon.pdf>
- DASKIN, A., TEKIN, N., AKCAY, E. 2003. The effect of transcervical intrauterine and intravaginal insemination methods on fertility in dogs. *Turk J Vet Anim Sci.* 27: 235-239.
- GOBELLO, C., CORRADA, Y. 2003. Biotechnology in canine reproduction: an update. *Anal Vet.* 23: 30-37.
- GROPETTI, D., ARALLA, M., BRONZO, V., BOSI, G., PECILE, A., ARRIGHI, S. 2015. Periovulatory time in the bitch: What's new to know? Comparison between ovarian histology and clinical features. *Anim Reprod Sci.* 152: 108-116.
- GÜMEN, A., KESKIN, A., YILMAZBAS-MECITOGLU, G., KARAKAYA, E., ÇEVİK, S., BALCI, F. 2011. Effects of GnRH, PGF 2 α and oxytocin treatments on conception rate at the time of artificial insemination in lactating dairy cows. *Czech J. Anim. Sci.* 56(6): 279–283.

- HAŞEGAN, I., ŞONEA, A., MATEI, M., VINTILĂ, L., ION, C., BÎRȚOIU, A. 2012. Current relevant knowledge on dog reproductive physiology – a Review 45(1): 172-180.
- HIEMSTRA, M., SCHAEFERS-OKKENS, A.C., TESKE, E, KOOISTRA, H.S. 2001. The reliability of vaginal cytology in determining the optimal mating time in the bitch. *Tijdsch Diergen*. 126: 685-689.
- HOLLINSHEAD, F., HANLON, D. 2017. Factors affecting the reproductive performance of bitches: A prospective cohort study involving 1203 inseminations with fresh and frozen semen. *Theriogenology*. 101: 62-72.
- HOLLINSHEAD, F., HANLON, D. 2019. Normal progesterone profiles during estrus in the bitch: A prospective analysis of 1420 estrous cycles. *Theriogenology*. 125: 37-42.
- HOPPER, B.J., RICHARDSON, J.L., LESTER, N.V. 2004. Spontaneous antenatal resolution of canine hydrops fetalis diagnosed by ultrasound. *J Small Anim Pract*. 45: 2-8.
- HYE, J.K., HYUN, J.O., JANG, G., MIN, K.K. 2007. Birth of puppies after intrauterine and intratubal insemination with frozen-thawed canine semen. *J Vet Sci* 2007. 8: 75-80.
- IVANOVA, C., GEORGIEV, P. 2018. Pregnancy in the bitch – A physiological condition requiring specific care – Review. *TMVM*. 1(4): 77–82.
- IVANOVA-KICHEVA, M., GRADINARSKA, D., DASKALOVA, D. 2015. Reproductive biotechnology in animal husbandry – current status and future prospects. *Biotech Anim Husbandry*. 31(4): 467-480.
- JIN-KIM, H., JU-OH, H., JANG, G., KYU-KIM, M. 2007. Birth of puppies after intrauterine and intratubal insemination with frozen-thawed canine semen. *J. Vet. Sci*. 8(1): 75–80.
- KABILAN, A. 2014. Pharmacological role of oxytocin – A short review. *J Pharm Sci Res*. 6(4): 220-223.
- KAYE, B.M., BOROFFKA, S.A.E.B, HAAGSMAN, A.N., TER HAAR, G. 2015. Computed tomographic, radiographic, and endoscopic tracheal dimensions

in english bulldogs with grade 1 clinical signs of brachycephalic airway syndrome. *Vet Rad Ultras.* 56: 609–616.

- KLINC, P., MAJDIC, G., STERBENC, N., CEBULJ-KADUNC, N., BUTINAR J., KOSEC, M. 2005. Establishment of a pregnancy following intravaginal insemination with epididymal semen from a dog castrated due to benign prostatic hiperplasia. *Reprod Dom Anim.* 40: 559–561.
- LAMM, C.G., MAKLOSKY, C.L. 2012. Current advances in gestation and parturition in cats and dogs. *Vet Clin Small Anim.* 42: 445–456.
- LANNA, L.L., MARQUES JR, A.P., DOUGLAS, R.H. 2010. Effect of deslorelin on the induction of estrus in anestrus bitches. *Arq Bras Med Vet e Zootec.* 62(3): 615-621.
- LAWLER, D.F., JOHNSTON, S.D., KELTNER, D.G., BALLAM, J.M., KEALY, R.D., BUNTE. T., LUST, G., MANTZ, S.L., NIE, R.C. 1999. Influence of restricted food intake on estrous cycles and pseudopregnancies in dogs. *Am J Vet Res.* 60: 820–825.
- LINDE-FORSBERG, C., FORSBERG, M. 1989. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J Reprod Fertil Suppl.* 39: 299–310.
- LINDE-FORSBERG, C., STRÖM HOLST, B., GOVETTE, G. 1999. Comparison of fertility data from vaginal vs. intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology.* 52: 11-23.
- MACEDO, S.P., MALM, C., HENRY, M.R., TELLES, L.F., FIGUEIREDO, M.S., FUKUSHIMA, F.B., NEVES, M.M., CAVALCANTI, G.A., CHAVES, M.S., MASCARENHAS, R.M., LAGARES, MDE.A., GHELLER, V.A. 2012. Endoscopic transcervical intrauterine artificial insemination in Labrador Retriever bitches. *Res Vet Sci.* 92(3):494-500.
- MAKLOSKI, C.L. 2012. Clinical techniques of artificial insemination in dogs. *Vet Clin Small Anim.* 42: 439–444.
- MARNET, P.G., MCKUSICK, B.C. 2001. Regulation of milk ejection and milkability in small ruminants. *Livest Prod Sci.* 70(1-2): 125-133.

- MASON, S.J. 2016. A retrospective clinical study of endoscopic-assisted transcervical insemination in the bitch with frozen–thawed dog semen. *Reprod Dom Anim.* 51(Suppl. 3): 1–6.
- MASON, S.J. 2018. Current review of artificial insemination in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 48: 567-580.
- MASON, S.J., ROUS, N.R. 2014. Comparison of endoscopic-assisted transcervical and laparotomy insemination with frozen-thawed dog semen: A retrospective clinical study. *Theriogenology* 82: 844–850.
- MOXON, R., COPLEY, D., ENGLAND, G.C.W. 2010. Quality assurance of canine vaginal cytology: a preliminary study. *Theriogenology.* 74: 479–485.
- NAGASHIMA, J.B., HANSEN, B.S., SONGSASEN, N., TRAVIS, A.J., PLACE, N.J. 2016. Anti-Müllerian hormone in the domestic dog during the anestrus to oestrous transition. *Reprod Dom Anim.* 51: 158–164.
- NIŻAŃSKI, W. 2005. Comparisons of results of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with frozen–thawed semen. *EJPAU* 8(4): #12.
- NÖTHLING, J.O., SHUTTLEWORTH, R., DE HAAS, K., THOMPSON, P.N. 2005. Homologous prostatic fluid added to frozen–thawed dog spermatozoa prior to intravaginal insemination of bitches resulted in better fertility than albumin-free TALP. *Theriogenology* 64: 975–991.
- OGASA, A., OHARA, N., HIRONAKA, T., ORIMA, H., SHIBA, Y., SHIMIZU, T., TSUTSUI, T. 2011. Relationship between the number of sperms and the rate of implantation in bitches inseminated into unilateral uterine horn. *Japan J Vet Sci.* 51: 257–263.
- OHTAKI, T., KOGA, Y., ONO, M., WATANABE, G., TAYA, K., TSUMAGARI, S. 2015. GnRH analogue treatment on LH surge day 0 followed by single transvaginal artificial insemination with frozen semen on day 5 in bitches. *J Vet Med Sci.* 77(1): 123–126.
- OKAZAKI, T., IKOMA, E., TINEN, T., AKIYOSHI, T., MORI, M., TESHIMA, H. 2014. Addition of oxytocin to semen extender improves both sperm transport to the oviduct and conception rates in pigs following AI. *Anim Sci J.* 85(1):8-14.

- OLDENBROEK, K., WAAIJ, L. 2014. Textbook animal breeding: animal breeding and genetics for BSc students. Centre for Genetic Resources and Animal Breeding and Genomics Group, Wageningen University and Research Centre – 311.
- ORTEGA-PACHECO, A., RODRÍGUEZ-BUENFIL, J.C., SEGURA-CORREA, J.C., BOLIO-GONZALEZ, M.E., JIMÉNEZ-COELLO, M., LINDE FORSBERG, C. 2006. Pathological conditions of the reproductive organs of male stray dogs in the tropics: prevalence, risk factors, morphological findings and testosterone concentrations. *Reprod Domest Anim.* 41: 429-437.
- ORTEGA-PACHECO, A., SEGURA-CORREA, J.C., JIMENEZ-COELLO, M., LINDE FORSBERG, C. 2007. Reproductive patterns and reproductive pathologies of stray bitches in the tropics. *Theriogenology.* 67: 382–390.
- PACKER, R.M.A., HENDRICKS, A., BURN, C.C. 2012. Do dog owners perceive the clinical signs related to conformational inherited disorders as “normal” for the breed? A potential constraint to improving canine welfare. *Anim Welf.* 21(1): 81–93.
- PRAPAIWAN, N., SRISUWATANASAGUL, S., KUNKITTI, P., MOONARMART, W, MANEE-IN, S. 2015. Immunolocalization of oxytocin receptor in the bitch cervix at different phase of estrous cycle. *Pak Vet J.* 35(4): 484-488.
- PRETZER, S.D. 2008. Canine embryonic and fetal development: A review. *Theriogenology* 70: 300–303.
- RAULT, J.L., VAN DEN MUNKHOF, M., BUISMAN-PIJLMAN, F.T.A. 2017. Oxytocin as an indicator of psychological and social well-being in domesticated animals: A critical review. *Front Psychol.* 8: 1521.
- REDDY, K.C.S., RAJU, K.G.S., RAO, K.S., RAO, K.B.R. 2011. Vaginal cytology, vaginoscopy and progesterone profile: breeding tools in bitches. *Iraqi J Vet Sci.* 25(2): 51-54.
- REZENDE, R.S., EURIDES, D., BARBOSA, C.P., LACERDA, M.S., SAMPAIO, R.L., GOMES, A.L. 2018. Use of a GnRH synthetic analog (buserelin) for

- estrous induction in female dogs. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 70(3): 656-660.
- RIJSSELAERE, T., ENGLAND, G., FREEMAN, S., MAES, D., VAN SOOM, A. 2014. Current knowledge on the transport and fate of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. *Reprod Domest Anim.* 49(2): 2-7.
- RODAS-RUIZ, J., TABARES-SERNA, C.J., GIRALDO-ECHEVERRI, C.A. 2015. Evaluation of prostaglandin F₂ α , estradiol benzoate and deslorelin acetate protocol for oestrus induction in bitches. *Arch Med Vet.* 47: 395-399.
- ROMO-VALDEZ J, ROMO-RUBIO J, BARAJAS-CRUZ R, GÜÉMEZ-GAXIOLA H, RODRÍGUEZ-GAXIOLA M, URÍAS-CASTRO C. 2017. Effect of the supplementation of oxytocin to the semen on the seasonal infertility of the sows. *AbanicoVet.* 7(2): 22-33.
- ROOT-KUSTRITZ, M.V. 2012. Managing the reproductive cycle in the bitch. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 42(3): 423-437.
- SALEH, W.M., SHAMKHI, A. 2018. Some physiological features of the bitch. *GJBB.* 7(1): 1-7.
- SANCHEZ, A., ROJAS, G., MORENO, P. 2010. Interrupción de gestación en una perra mediante un tratamiento combinado de cloprostenol y cabergolina. *Rev. Investig. Vet.* 1(01): 130-135.
- SATHIAMOORTHY, T., SABARINATHAN, A., KULASEKAR, K., PARTHIBAN, S., SRIDEVI, P., RANGASAMY, S. 2017. Conception rate following transcervical artificial insemination with frozen semen in bitches. *Indian Vet J.* 94(07): 49-50.
- SCHÄFER-SOMI, S. 2015. New approaches to treatment of infertility in the bitch. *Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte.* 39(1) 245-250.
- SHINDE, S., KRISHNAPPA, B., KUMAR, B., PERUMAL, P., GUPTA, H.K., SRIVASTAVA, S.K. 2014. Induction of fertile estrus in bitch (Pug) with cabergolin - a case report. *Inter J Vet Sci.* 3(1): 1-3.
- SILVA, L.D.M., ONCLIN, K., SNAPS, F., VERSTEGEN, J. 1995. Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. *Theriogenology.* 43: 615-623.

- SIRIVAIIDYAPONG, S. 2011. Control of oestrus and ovulation in dog and cat: an update. *Thai J Vet Med Suppl.* 41:65-68.
- TANČIN, V., BRUCKMAIER, R.M. 2001. Factors affecting milk ejection and removal during milking and suckling of dairy cows. *Vet Med – Czech*, 46(4): 108–118.
- TAVERNE, M.A.M., VAN DER WEIJDEN, G.C. 2008. Parturition in domestic animals: Targets for future research. *Reprod Dom Anim.* 43(5): 36–42.
- THOMASSEN, R., FARSTAD, W. 2009. Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding and conservation. *Theriogenology.* 7: 190–199.
- THOMASSEN, R., SANSON, G., KROGENÆS, A., FOUIGNER, J.A., BERG, K.A., FARSTAD, W. 2006. Artificial insemination with frozen semen in dogs: A retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. *Theriogenology.* 66: 1645–1650.
- TSUTSUI, T., SHIMIZU, T., OHARA, N., SHIBA, Y., HIRONAKA, T., ORIMA, H., OGASA, A. 1989. Relationship between the number of sperms and the rate of implantation in bitches inseminated into unilateral uterine horn. *Nihon Juig Zass.* 51: 257-263.
- TSUTSUI, T., HORI, T., YAMADA, A., KIRIHARA, N., KAWAKAMI, E. 2003. Intratubal insemination with fresh semen in dogs. *J Vet Med Sci.* 65(5): 659-661.
- VERSTEGEN, J., VERSTEGEN-ONCLIN, K., REYNAUD, K. 2011. Biotechnology of reproduction in the canine species: where do we go? *Acta Sci Vet.* 39(1): s303.
- VIERO, C., SHIBUYA, I., KITAMURA, N., VERKHRATSKY, A., FUJIHARA, H., KATOH, A., UETA, Y., ZINGG, H.H., CHVATAL, A., SYKOVA, E., DAYANITHI, G. 2010. REVIEW: Oxytocin: Crossing the bridge between basic science and pharmacotherapy. *CNS Neurosci Ther.* 16(5):e138-56.
- WYDOOGHE, E., BERGHMANS, E., RIJSSELAERE, T., VAN SOOM, A. 2013. International breeder inquiry into the reproduction of the English bulldog. *Vla Diergen Tijdsch.* 82: 38–43.