

INDUCCIÓN DE CICLOS ESTRALES EN LA PERRA: ACTUALIZACIÓN BIBLIOGRÁFICA

M C Stornelli¹, F Gimenez¹, C M Tittarelli², C A Savignone³,
R L de la Sota¹, M A Stornelli¹

Instituto de Teriogenología¹, Cátedra de Fisiología², Cátedra de Histología y Embriología³,
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Resumen: La inducción de ciclos estrales puede implementarse en aquellas perras con diagnóstico de intervalos interestrales prolongados no relacionados con enfermedad subyacente. Así mismo la inducción de ciclos estrales puede también utilizarse para lograr nacimientos en épocas del año en que aumenta notablemente la demanda de cachorros en el mercado. Por otra parte la inducción y sincronización de ciclos son prerequisites para los programas de transferencia embrionaria. Los métodos comunicados para la inducción de estro en la perra incluyen: 1) combinación de gonadotrofinas (eCG y hCG o hMG), gonadotrofinas de la pituitaria (FSH y LH) o dietilestibestrol. y FSH, 2) Utilización de GnRH y sus agonistas (buserelina y cistorelina) o superagonistas (nafarelina, lutrelina),. 3) Utilización de prostaglandinas para inducir luteólisis y acortar el diestro. 4) Terminación del anestro mediante la utilización de los agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, cabergolina) que disminuyen los niveles séricos de prolactina acortando así los períodos interestrales. En este trabajo se discuten las ventajas y desventajas de los protocolos disponibles para la inducción de ciclos fértiles en la perra doméstica.

Palabras clave: perra, inducción de celo, agonistas GnRH, agonistas dopaminérgicos, gonadotrofinas

Oestrus induction in the bitch a review

Abstract: Estrus induction in the bitch is indicated in many cases. It may be considered for treatment of primary or secondary anestrus in which there has not been found any underlying cause; it may be also used in cycling induction in order to synchronize pregnancy and whelping in the more convenient time. In addition, reliable synchronous estrus induction is really important for canine embryo transfer programs. Reported methods for canine estrus induction include the use of exogenous gonadotropins (luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, human chorionic gonadotropin, pregnant mare serum gonadotropin, and human menopausal gonadotropin) or their combination with synthetic estrogens (diethylstilbestrol), GnRH agonists (lutrelin, buserelin, fertirelin, deslorelin, and leuprolide), prostaglandin and dopamine agonists (bromocryptine and cabergoline). These methods have a widely difference in efficacy of induction as well as in fertility of the estus. This review will summarize published reports on estrus induction.

Keywords: bitch; Estrus induction; GnRH agonist; Dopamine agonist; Gonadotropin

Fecha de recepción: 18/08/06

Fecha de aprobación: 12/10/06

Dirección para correspondencia: Alejandra Stornelli, Cátedra de Reproducción. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296 (B1900AVW) La Plata. Argentina.

E-mail: astornel@fcv.unlp.edu.ar

Introducción

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. Es así que se han evaluado diversos métodos para inducir ciclos fértiles y se han implementado nuevos protocolos de inducción en un intento de lograr mejores resultados. El aumento del valor y las posibilidades de comercialización de los cachorros de pura raza, así como la creciente importancia de la cría canina tanto desde el punto de vista económico, recreativo o para la obtención de perros de trabajo ha impulsado el estudio y desarrollo de diversos métodos orientados al manejo del ciclo estral de la perra. En concordancia con estos hechos, una práctica en continuo estudio y desarrollo es la inducción de ciclos fértiles que hagan posible el nacimiento de cachorros en relación a las necesidades del criador. La inducción de ciclos estrales puede implementarse en aquellas perras con diagnóstico de intervalos interestrales prolongados no relacionados con enfermedad subyacente que pueda considerarse la causa de los mismos. La mayoría de los protocolos utilizados fueron evaluados en perras normales, por esto al implementarse en hembras con problemas subyacentes que afecten el normal funcionamiento del eje hipotálamo-pituitaria-ovario los resultados son pobres (1).

La inducción de ciclos estrales para lograr nacimientos en épocas del año en que aumenta notablemente la demanda de cachorros en el mercado (navidad, día del niño, etc), permite concentrar las pariciones de un gran número de perras en estos períodos del año. Este hecho se encuentra íntimamente relacionado con la obtención de mejores precios por la venta de cachorros.

Existe suficiente evidencia de la presencia de un "efecto dormitorio" en cánidos. Puede observarse que perras en anestro medio o tardío que conviven con hembras en proestro u estro acortarán la duración de su anestro en al menos 30 días (2). Este fenómeno "natural" de inducción de estros es mediado por feromonas, pero el mecanismo mediante el cual aumenta la secreción de gonadotrofinas es aún desconocido. Sin embargo desde 1939 se han investigado más de 40 protocolos de inducción farmacológica del estro en perras (3).

Particularidades fisiológicas del ciclo estral canino

El ciclo estral de los cánidos difiere de manera considerable del de otras especies. En la perra doméstica, la fase folicular y ovulación espontánea son seguidas de una fase lútea con una duración promedio de 75 días (1). Un periodo

de anestro no estacional y de duración variable, (2-10 meses), le sigue a cada ciclo estral (4). Los factores que regulan la duración del anestro, la terminación del mismo y el comienzo de una nueva fase folicular en las perras aún no se comprenden en su totalidad. En perras normales la progresión desde el anestro temprano al tardío, se asocia con el incremento en la concentración plasmática de FSH, luego de un aumento de la pulsatilidad de GnRH siendo este un evento crítico para la iniciación de la foliculogénesis (5). También se ha observado durante esta transición un aumento en la sensibilidad de la pituitaria a la GnRH (1), un aumento en la respuesta ovárica a las gonadotrofinas (6), un incremento en las concentraciones plasmáticas de LH hacia el final del anestro (7), relacionadas con un breve período de aumento de la secreción pulsátil de LH (8), considerándose a estos eventos determinantes en el inicio de una nueva fase folicular.

Por otra parte se ha sugerido que los cambios en la secreción de LH pueden ser más importantes que los cambios en la secreción de FSH para el inicio de una nueva fase folicular que conducirá a la ovulación (1, 9). Es también importante observar que se produce un aumento en las concentraciones de estradiol antes del comienzo del proestro, unos 30 días antes del estro, el significado de este incremento aún no está bien entendido, pero puede ser el principal estímulo sobre el eje hipotálamo-pituitaria-ovario para iniciar la liberación pulsátil de LH (6). Este mecanismo de acción es confirmado por la inducción de celos fértiles lograda en perras luego de la administración de dietilestibestrol (10).

Inducción de ciclos fértiles

La inducción de ciclos y la reducción del intervalo interestro en la perra pueden realizarse mediante cuatro alternativas (11). La primera alternativa incluye la utilización de una combinación de gonadotrofinas (eCG y hCG o hMG), gonadotrofinas de la pituitaria (FSH y LH) o dietilestibestrol y FSH. La segunda alternativa incluye la utilización de GnRH y sus agonistas (buserelina y cistorelina) o superagonistas (nafarelina, lutrelina), para estimular la liberación de hormonas gonadotrópicas endógenas de la hipófisis. La tercera alternativa incluye la utilización de prostaglandinas para inducir luteólisis y acortar el diestro. La cuarta y última alternativa incluye la terminación del anestro mediante la utilización de los agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, cabergolina, metergolina) que actúan inhibiendo la prolactina y acortando así los períodos interestrales (1).

Gonadotropinas:

Las gonadotrofinas disponibles comercialmente y utilizadas en perros son la FSH, la eCG, la LH porcina, la hCG y la hMG (11, 12).

Existen tejidos diferentes a los de la hipófi-

sis que son capaces de producir gonadotrofinas, a estas hormonas se las conoce como hormonas del tipo hipófisis anterior. Las dos fuentes más importantes de tales hormonas, de interés en medicina veterinaria, son el suero de yegua gestante y la orina de mujer embarazada. Del primero se obtiene la eCG, y de la segunda la hCG.

La eCG es una glicoproteína, con un peso molecular de 68.000 y una vida media de aproximadamente 26 horas. Esta hormona se forma en las copas endometriales del útero de yegua gestante y está presente en la sangre del animal entre los días 40 y 140 de gestación, alcanzando un máximo el día 80 (13).

En la mayoría de las especies la actividad biológica de la eCG es similar a la de FSH, presentando también algunas acciones semejantes a LH. Por lo tanto la eCG puede sustituir a la FSH. Su período de acción es largo debido a que no pasa el filtro renal y se mantiene en circulación tanto si ha sido inyectada como si ha sido producida por el mismo animal. En la yegua la eCG tiene actividad luteotrófica, provee estimulación para el mantenimiento de los cuerpos lúteos primarios y es responsable del control de la formación y mantenimiento de los cuerpos lúteos accesorios. Con el incremento de la eCG, a menudo la yegua ovulará generándose los cuerpos lúteos accesorios. La ovulación inducida por esta hormona ocurrirá entre los días 40 y 70 de preñez, ocurriendo también luteinización en los folículos antrales que no ovularon. Por lo tanto la eCG posee en la yegua, un importante impacto sobre la habilidad del ovario para producir P₄. Esta hormona atraviesa la placenta por lo que también son estimuladas la gónadas del feto. En adición a su acción luteotrófica, la eCG posee una fuerte acción semejante a FSH cuando es administrada a hembras de otras especies. En realidad esta hormona causará un marcado desarrollo folicular en la mayoría de las especies y es utilizada para inducir superovulación (14).

La eCG es utilizada ampliamente en medicina veterinaria como un método eficaz y de bajo costo para inducir el desarrollo folicular en los ovarios inactivos de animales sexualmente maduros. Por otra parte, esta hormona posee suficiente actividad LH para provocar ovulación en la mayoría de los casos. Los ovarios inactivos que por cualquier causa se encuentran en estado quiescente pueden entrar en actividad luego de la administración de eCG. Una sola administración por vía subcutánea de eCG suele producir crecimiento folicular en la vaca luego de 2 a 5 días. Con dosis elevadas se puede producir super-ovulación. Se han evaluado en detalle varios procedimientos de inducción de la ovulación en vacas, yeguas, ovejas, cabras y cerdas.

La hCG es una proteína que consta de dos cadenas peptídicas (α y β) y que contiene galactosa y hexosamina, su peso molecular es de

30.000 y posee una vida media de 8 a 12 horas. Es químicamente diferente de la hormona luteinizante pero su acción biológica es muy semejante, teniendo también cierta actividad semejante a FSH. La hCG se forma en los citotrofoblastos de las vellosidades coriónicas de la placenta humana y aparece en la orina a las pocas semanas de la concepción, alcanzando su valor máximo hacia el día 50 de gestación, a partir del cual decrece hasta valores casi nulos. Desde el punto de vista farmacológico la hCG es un producto de bajo costo que causa ovulación en la hembra y estimula las células de Leydig aumentando la producción de andrógenos en el macho. Su uso en medicina veterinaria es amplio, para provocar ovulación en la yegua en el momento de ser servida, como agente terapéutico para inducir luteinización y posible ovulación en quistes ováricos en el ganado vacuno y en la terapéutica para el criptorquidismo en todas las especies. La administración de hCG puede estimular los ovarios de cualquier especie animal (13).

Los métodos de inducción utilizando gonadotrofinas exógenas comprenden: 1) administración seriada de FSH o eCG para inducir el desarrollo de los folículos y el proestro. 2) administración seriada de FSH o eCG para inducir el desarrollo folicular seguida de la administración de LH o hCG para provocar la ovulación de los folículos desarrollados. 3) protocolos similares a los descritos en el punto 1 y 2 precedidos por tratamientos con estrógenos para lograr la sensibilización estrogénica del eje hipófisis/ovario. 4) LH porcina purificada. 5) hMG (12, 15).

En la perra se ha estudiado la eficacia de varios protocolos combinando eCG y hCG habiéndose observado diferentes resultados. La eCG se utilizó con dosis de 20 UI/kg/d vía IM o SC durante 5 o 10 d o con una dosis de 44UI/kg/d durante 9 d. En ambos casos la inducción de la ovulación se obtuvo con una dosis IM o SC de 500 UI de hCG (1, 16). Los resultados comunicados fueron la inducción de ciclos en el 60 al 100% de los casos, la ovulación en el 40 al 80% de los casos y la preñez en el 9 al 56 % de los casos. Por otra parte cuando se utilizaron altas dosis de eCG, como 250 UI/kg SC durante 20 d o hasta aparición de proestro, seguida de 500 UI de hCG y 500 UI sc durante 10 d seguida de la administración de 500 UI SC de hCG, se observaron signos de proestro en el 90% a 100% de las perras tratadas pero las tasas de preñez fueron de alrededor del 20%(17, 18). En líneas generales y como conclusión de la revisión de diversos trabajos, cuanto menos fueron los días de administración de la eCG, mayor fue el porcentaje de preñez (e.g 5 d, 50-56% vs. 9-10 d 9-35%; (1). De hecho, se ha comunicado trombocitopenia debido a hiperestrogenismo en el 29% de las perras tratadas con una dosis de 20 UI/kg/d durante 10 d (19). En aquellas perras que fueron tratadas con 500 UI/kg IM durante 10 d seguido de una dosis de GnRH de 50 μ g se observaron signos proestro en el 100% de

las perras mientras que las tasas de preñez fueron del 0% (1).

Puede observarse que, durante las décadas de los 70 y 80 se trabajó intensamente en protocolos de inducción de celos con eCG y hCG. Sin embargo con dichos protocolos se obtuvo una mediana a baja fertilidad con rango muy amplio de variabilidad de los mismos. Una posible explicación de dichos resultados es la utilización de dosis de eCG muy elevadas (44UI/kg/d) y durante un período muy prolongado (9-10 d). Por ejemplo una perra de 25 kg recibía una dosis diaria de 1100 UI/d y una dosis total de 11000 UI. La dosis recomendada para la vaca es de 500-1000 UI en una sola dosis. De esto se desprende que tal vez la dosis utilizada en la perra es demasiado alta y el hiperestrogenismo que se produce es el resultado de administrar una dosis superovulatoria. De hecho, la utilización de un protocolo con dosis más reducidas (29 UI/kg/d, 500 UI, perra 25 kg) y durante un período más corto (5 d) alcanzó resultados cercanos al 50% de preñez. (1). Otros autores observaron falla luteal prematura con acortamiento del diestro y pérdida de la preñez luego del uso de eCG (20, 21, 22).

Los protocolos que utilizan FSH como estímulo foliculotrópico tienen menos éxito en el logro de inducción de ovulación y gestación que los que utilizan eCG (23). Se utilizaron protocolos de inducción combinando FSH y LH en un intento de asemejar lo que ocurre en condiciones naturales hacia el final del anestro, pero sin buenos resultados (2, 23). Sin embargo, la utilización de inyecciones seriadas de FSH o LH después de un régimen de preparación con estrógenos usando dietilestilbestrol ha tenido éxito en la inducción del estro y ovulaciones fértiles. Cuando se utilizó dietilestilbestrol a dosis de 5 mg diarios durante 5 a 7 d para producir signos de proestro y luego se administró 5mg de LH vía intramuscular el d 5 después del comienzo del proestro o 10 mg de FSH por vía intramuscular los d 9 y 11 a partir del primer día del proestro, todas las perras quedaron preñadas (24). En un estudio en el que se sustituyó LH por hCG la fertilidad y la incidencia de comportamiento estral no fueron tan exitosos (25).

Por otra parte fue estudiado también el rol de la LH en el inicio de la fase folicular en perros. Se evaluaron protocolos con LH porcina purificada en perras en anestro. Los resultados demostraron que la LH puede utilizarse para inducir estro en perras en anestro con ciclos estrales normales (26).

GnRH y sus agonistas:

Otros métodos de inducción implican la administración de GnRH exógena o agonistas de GnRH para producir la liberación de gonadotropinas endógenas desde la hipófisis, crecimiento fo-

licular y estro. La ovulación en estos casos ocurre como resultado de la oleada endógena de gonadotropinas, el crecimiento folicular y secreción de estrógenos. Sin embargo no se disponen de datos sobre la administración de LH o hCG para facilitar la ovulación de los folículos inducidos. En condiciones naturales, la secreción pulsátil de GnRH cada 70-90 min media la síntesis y liberación de FSH y LH de la pituitaria. La administración pulsátil de GnRH a dosis de 0.2-0.4 µg/kg cada 90 min es suficiente para obtener incrementos de LH semejantes a los pulsos endógenos que ocurren hacia el final del proestro.

Los protocolos descritos incluyen 1) administración endovenosa pulsátil de GnRH cada 90 min durante 6 o 12 d (27), 2) goteo subcutáneo constante de un agonista de la GnRH durante 14 d (28) y 3) administración por vía subcutánea de un agonista de GnRH 3 veces por d durante 14 d (29).

En perras en anestro, la administración de GnRH en forma pulsátil utilizando 40 a 400 ng/kg cada 90 min produjo la aparición de proestro en 3 a 6 d seguido de estro y ovulación en 2 semanas con tasas de fertilidad del 37% al 85% (27, 29). Sin embargo el costo que insume la utilización de bombas de infusión, lo hace impráctico para su uso rutinario. El goteo subcutáneo también indujo proestro y estro, con tasas de fertilidad del 25% si se lo administraba después del final de la lactación y del 50% si se administraba durante el anestro después de ciclos sin gestación (28). Este método también carece de practicidad ya que la implantación y extracción subcutánea de las bombas de infusión osmóticas requieren una cirugía menor. La administración subcutánea de un agonista de GnRH (DTrp-6 GnRH), a dosis de 1 ng/kg cada 8 h, durante 3 d, dio lugar a estro entre los 9 y 11 d en el 80% de las perras, quedando todas preñadas. A pesar del inconveniente de las tres inyecciones diarias este protocolo parece presentar la mejor combinación de eficacia y utilidad clínica en la utilización de hormona liberadora de gonadotropina (27, 28, 29).

Existen en la actualidad más de 700 agonistas GnRH los que poseen mayor afinidad por el receptor y mayor estabilidad. Uno de ellos es Deslorelin, cuyas aplicaciones en medicina veterinaria fueron introducidas por Trigg para realzar supresión del estro. Ovuplant® (Fort Dodge Animal Health, Overland Park, KS, USA) es un implante subdérmico biodegradable, de liberación sostenida, que contiene 2,1 mg de deslorelin y que posee licencia para su utilización en yeguas. Los estudios preliminares en perras mostraron que podía ser eficaz en la inducción y sincronización de ciclos estrales (30). Sin embargo debido al escaso número de perras incluida en los estudios es necesario realizar investigaciones futuras con estas formulaciones (3).

Luego de la inducción de ciclos con agonis-

tas GnRH se observó falla lútea prematura con acortamiento del diestro y subsecuente pérdida de la preñez (28, 30, 31). Por otra parte la administración prolongada de estos fármacos resultó en sobre-estimulación de la pituitaria, supresión de la secreción de LH, disminución de la respuesta lútea a la LH y disminución de la secreción de progesterona (3, 31).

Prostaglandina y sus análogos:

La prostaglandinas administradas durante el diestro pueden ser utilizadas con éxito para acortar el intervalo interestral mediante la inducción de luteólisis y acortamiento de la fase lútea. Fenprostalene, un análogo de las prostaglandina f (2) (alpha) de larga acción, utilizado 25 días después de la ovulación, a dosis de 50 ug totales produjo regresión temprana del cuerpo y acortamiento del intervalo interestral en 80 días (32).

Agonistas dopaminérgicos

La prolactina juega un rol importante en la duración del intervalo interestral, posiblemente afectando la liberación de gonadotropinas y/o la respuesta del ovario a las mismas. La supresión de la secreción de prolactina por la administración de agonistas dopaminérgicos, acorta la duración del anestro o induce estro en perras con anestro prolongado (33, 34).

Los agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina y cabergolina, han sido utilizados con éxito para la inducción de ciclos estrales. La dopamina inhibe la liberación de prolactina desde la pituitaria anterior, concomitantemente el tratamiento con inhibidores de la prolactina disminuye el intervalo interestral e induce el estro en perras con anestro prolongado (35). La administración de bromocriptina y cabergolina, administrados en la fase lútea y anestro, reduce la duración de ambos (36). Algunos investigadores han reportado la terminación del anestro dentro de los 50 días de tratamiento, mientras que otros dentro de los 28 días (2, 37, 38). Bromocriptina, es un agonista del receptor dopaminérgico D2, pero también afecta los receptores serotoninérgicos y adrenérgicos (38), este compuesto también atraviesa la barrera sangre-cerebro. Por otra parte, cabergolina posee una mayor bio-potencia y afinidad por el receptor D2 que la bromocriptina, una menor afinidad por los receptores serotoninérgicos y una duración de acción mayor. Conjuntamente posee menos efectos en el sistema nervioso central (38).

Los agonistas dopaminérgicos han sido utilizados satisfactoriamente en muchas perras, pero este método de inducción de estro puede requerir más de treinta días de tratamiento, dependiendo del estadio del anestro (temprano o tardío) en el que se encuentra la perra (38).

La bromocriptina está disponible comercialmente para la utilización en humanos y se

ha utilizado en dosis de 20 a 250 µg/kg observándose una incidencia de aparición de signos de estro y tasas de preñez del 71 al 100% y 100% respectivamente. Pueden ser necesarios tratamientos de 1 a 3 meses antes de observar los signos de proestro. Rara vez se observan efectos secundarios importantes pudiendo aparecer vómitos cuando se utilizan dosis altas (36, 39). La cabergolina es el agonista dopaminérgico con el que se obtuvieron los mejores resultados, está disponible para su utilización en medicina veterinaria y utilizado a dosis de 5 ug/kg se lograron tasas de preñez del 83 a 93% (5). Sin embargo es importante destacar que el tiempo transcurrido entre la realización del tratamiento y la ocurrencia del proestro post tratamiento es sumamente variable (entre 1 y 3 meses). Este hecho hace que no puedan utilizarse estas drogas para sincronizar los ciclos en las perras, de tal manera que las pariciones ocurran en la épocas de mayor demanda de cachorros. Así mismo el tiempo prolongado de administración se relaciona con el incremento del costo del tratamiento, la complicación de la administración diaria de la droga y el desaliento del propietario.

Conclusiones

El escaso número de animales con el que se realizan los ensayos hace difícil realizar una adecuada evaluación de los protocolos de inducción en la perra. Investigaciones futuras orientadas a la evaluación de los diversos protocolos de inducción así como de las dosis y periodos de administración utilizados permitirán alcanzar mejores resultados en la inducción de ciclos fértiles, lográndose altas tasas de ovulación y de preñez evitando efectos colaterales indeseables en la madre. De esta manera podrá darse una respuesta adecuada a la insistente demanda de los criadores en relación a la obtención de cachorros en épocas determinadas del año en las que aumenta considerablemente la demanda de los mismos. En la actualidad, no se puede responder de manera adecuada a esta necesidad de los productores caninos y esto se relaciona con importantes pérdidas de dinero. Sin embargo es importante destacar que si bien la inducción de ciclos puede mejorar el manejo productivo de un criadero, de ninguna manera deben olvidarse los derechos del animal. Debe impedirse que la hembra se convierta en una "máquina" productora de cachorros sin tener en cuenta el bienestar animal.

Bibliografía

1. Johnston SD, Kuztritz MVR, Olson P. Canine and feline Theriogenology, Ed. WB Saunders. Philadelphia (United States), 2001; p. 262-264.
2. Concannon P W. Biology of gonadotropin secretion

A. Stornelli y col.

- in adult and prepubertal female dogs *J Reprod Fertil* (1993) 47 pp3-27.
3. Kutzler M A. Induction and synchronization of estrus in dog. *Theriogenology* (2005). (64) 766-775.
 4. Bouchard GF, Youngquist RS, Vaillancourt D. Seasonality and variability of the interestrus interval in the bitch. *Theriogenology* 1991; 36:41-50.
 5. Kooistra HS, Okkens AC, Bevers MM, Popp-Snijders C, van Haaften B, Dieleman SJ, Schoemaker J. Bromocriptine -induced premature oestrus is associated with changes in the pulsatile secretion pattern of follicle-stimulating hormone in beagle bitches. *J Reprod Fertil* 1999; 117: 387-393.
 6. Jeffcoate IA. Endocrinology of anestrus bitches. *J Reprod Fertil*; 1993, 47(Suppl.):69-76.
 7. Olson P N, Bowen R A, Behrendt M D. Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. *Biol Reprod* 1982; 27:1196-1206.
 8. Concannon PW, Whaley S, Anderso SP. Increased LH pulse frequency associated with termination of anestrus during the ovarian cycle of the dog. *Biol Reprod* 1986; 34: 119.
 9. Feldman E, Nelson R. Feline reproduction. In canine and feline endocrinology and reproduction, 2nd ed. WB Saunders, Philadelphia. 1996; p. 741-768.
 10. Bouchard G F, Gross S, Ganjam V K. Oestrus induction in the bitch with the synthetic oestrogen diethylstilbestrol. *J Reprod Fertil (Suppl)* 1993; 47: 515-516.
 11. Concannon PW, Lasley B, Vanderlip S. LH release, induction of oestrus and fertile ovulations in response to pulsatile administration of GnRH to anoestrous dogs. *J Rep Fert* 1997; 51:1-54.
 12. De La Sota RL, Soto AT, Gobello MC. Farmacología del estro y del parto. En Botana Lopez LM, Landoni MF, Martin-Jimenez T. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana. 2002; p. 423-432.
 13. McDonald LE. Hormonas de la hipófisis. En Booth NH, McDonald LE. *Farmacología y terapéutica veterinaria*. Primera Edición. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza España. 1996; p. 599-600.
 14. Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition. Second Edition. Current Conception, INC. Washinton. EE. UU. 2003.
 15. Wanke MM, Farina J, Loza MH. Induction of estrus in bitches with normal and persistent anestrus using human menopausal gonadotropin (hMG). *Theriogenology* 1997; 47: 935-942.
 16. Wright P J. The induction of oestrus in the bitch using daily injections of pregnant mare serum gonadotrophin. *Aust Vet J* 1982; 59: 123-124.
 17. Archabal LF, Baker BA, Clooney LC. A surgical method for collecting canine embryos after induction of estrus and ovulation with exogenous gonadotropins. *Vet Med Small Anim Clin*. 1980; 75: 228-238.
 18. Chaffaux S, Locci D, Pontois. M. Induction of ovarian activity in anoestrous beagle bitches. *Br Vet J*; 1984; 140: 191-195.
 19. Arnold S, Arnold P, Concannon PW, Weilenmann R, Hubler M, Casal M, Dobeli Fairburn A, Eggenberger E, Rusch P. Effect of duration of PMSG treatment on induction of estrus, pregnancy rates, and the complications of hyperoestrogenism in dogs. *J Reprod Fertil*; 39 (Suppl) 1989; 115-122.
 20. Nakao T, Aoto Y, Fukushima S. Induction of estrus in bitches with exogenous gonadotropins, and pregnancy rate and blood progesterone profiles. *Jpn J Vet Sci* 1985; 47: 17-24.
 21. Tsuda T, Nakao S, Nakao T. The induction of superovulation in the bitch with pregnancy mare serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin. *J Reprod Dev* 1995; 41: j89-j95.
 22. Weilenman R, Arnold S, Dobeli M, Rusch P, Zerobin K. Estrus induction in bitches by the administration of PMSG and hCG. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1993; 135: 236-41.
 23. Shille VM, Thatcher MJ, Simmons KJ. Efforts to induce estrus in the bitch, using pituitary gonadotropins. *JAVMA* 1984; 184: 1469-1473.
 24. Moses DL, Shille VM. Induction of estrus in greyhound bitches with prolonged idiopathic anestrus or with suppression of estrus after testosterone administration. *JAVMA* 1988; 192: 1541-1545.
 25. Shille VM, Thatcher MJ, Lloyd ML. Gonadotrophic control of follicular development and the use of exogenous gonadotrophins for induction of oestrus and ovulation in the bitch. *J Rep Fert* 1989; 39: 103-113.
 26. Verstegen J, Onclin K, Silva LDM. Use of ultra-pure porcine LH to induce follicular growth, estrus and pregnancy in the bitch. *Biol Reprod* 1993; 48 (Suppl 1): 127.
 27. Vanderlip SL, Wing AE, Felt P. Ovulation induction in anestrus bitches by pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone. *Lab Anim Sci* 1987; 37:459-464.
 28. Concannon PW. Induction of fertile oestrus in anoestrous dogs by constant infusion of GnRH agonist. *J Rep Fert*; 1989; 39:149-160.
 29. Cain JL, Cain GR, Feldman, EC. Use of pulsatile intravenous administration of gonadotropin-releasing hormone to induce fertile estrus in bitches. *Amer J Vet Res*; 1988; 49:1993- 1996.
 30. Kutzler, M A, Wheeler and R, Volkmann D.H. Canine estrus induction using the GnRH agonist, deslorelin, Proc Ann Meet Eur Vet Soc Small Anim Reprod, Eur Vet Soc Small Anim Reprod. 2001; pp. 147-148 [abstract].
 31. Mc Rae, G.I, Roberts B.B, Worden A.C, Bajka A, Vickery B.H Long-term reversible suppression of oestrus in bitches with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist. *J Reprod Fertil* 74 1985; pp. 389-397.
 32. Hori T, Akikawa, T.; Kawakami, F.; Tsuitsui, F. Effects of administration of prostagrandin F(2)(alpha)-analogue fenprostalene on canine corpus luteum and subsequent recurrence of estrus and fecundity. *J. Vet. Med Sci* 2002 Sep;64(9):807-11

33. Onclin K, Verstegen J, Silva L.D.M and Concannon P. Patterns of circulating prolactin, LH and FSH during dopamine-agonist induced termination of anestrus in beagle dogs. *Biol. Reprod.* 52 Suppl. 1995; p. 314
34. Okkens A.C, Kooistra H.S, Dieleman S.J and Bevers M.M. Dopamine agonistic effects as opposed to prolactin concentrations in plasma as the influencing factor on duration of anoestrus in bitches. *J. Reprod. Fertil.* 51 Suppl. 1997; pp. 55-58.
35. Jochle W, Arbeiter K, Post, K. Effect of pseudo pregnancy, pregnancy and interestrus interval of pharmacological suppression of prolactin secretion in female dogs and cats. *J Reprod Fertil (Suppl)* 1989; 39: 199-207.
36. Okkens AC, Bevers MM, Dieleman SJ. Shortening of the interestrus interval and the lifespan of the corpus luteum of the cyclic dog by bromocryptine treatment. *Vet Q* 1985; 7: 173-175.
37. Van Haften B, Dieleman SJ, Okkens A C. Induction of oestrus and ovulation in dogs by treatment with eCG and/or bromocriptine. *J Reprod Fertil* 1989(Suppl); 39: 303-339 (Abstract).
38. Verstegen J, Onclin K, Silva L, Concannon P. Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. *Theriogenology* 1999; 51:597-611.
39. Zoldag L, Fekete S, Csaky I, Bersenyi A. Fertile estrus induced in bitches by bromocryptine, a dopamine agonist: a clinical trial. *Theriogenology* 2001; 55:1657-66.