



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

Trabajo de tesis realizado para optar por el título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**“EVALUACIÓN ULTRASONOGRÁFICA DEL APARATO
REPRODUCTOR EN HEMBRAS CANINAS Y FELINAS EN LA
PUBERTAD Y RADIOGRÁFICA DE LOS CARTÍLAGOS DE
CRECIMIENTO EN CANINOS”**

AUTORA: VERCELLINI, María del Rosario, MV

DIRECTORA: BLANCO, Paula Graciela, DMV

CODIRECTORA: GOBELLO, Ma. Cristina, DMV, DECAR

**LUGAR DE TRABAJO: Centro de Fisiología Reproductiva y Métodos
Complementarios de Diagnóstico (CEFRE & MECODIAG), Facultad de
Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata**

MIEMBROS DEL JURADO:

Dra. DE PALMA, Viviana

Dra. GÓMEZ, Néida

Dra. QUIROGA, María Alejandra

AÑO 2022

A mi familia.

Después de varios años de esfuerzo, este proyecto de tesis finalizó dejándome un saldo positivo desde lo profesional y lo personal. No considero este logro de carácter individual, sino colectivo. Fue posible gracias a la oportunidad que me brindó mi país para estudiar y dedicarme al desarrollo de este trabajo, y debido al aporte fundamental de muchas personas a quienes quiero agradecer.

A mi Directora Paula Blanco, por su tiempo y dedicación para que este proyecto se realice, por compartir su conocimiento y su pasión por lo que hace y por su acompañamiento desde lo personal, mi infinito agradecimiento.

A mi co-Directora, Cristina Gobbels, por ser un ejemplo de dedicación y profunda pasión por el conocimiento y por el desarrollo de nuestra profesión. Por incorporarme al Centro de Fisiología Reproductiva de Métodos Complementarios de Diagnóstico, donde llevé adelante la tesis.

A mi familia por acompañarme. A mis viejos, Cacho y Miriam, por transmitirme la importancia del estudio y el trabajo y por darme las herramientas para desarrollar mi camino. A Clara, hermana y colega, por estar siempre. A Pablo, mi hermano mayor que me guía y acompaña.

A mi compañero, Santiago, por su amor y acompañamiento.

A la Universidad Nacional de la Plata y a la Facultad de Ciencias Veterinarias, por permitirme obtener el título de grado, ofreciendo una educación de calidad, pública, laica y gratuita. Por ser mi lugar de trabajo actual y donde conocí al grupo de personas que me abrieron el camino para concretar este proyecto.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por el financiamiento de la beca doctoral.

A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNLP, por los subsidios otorgados que permitieron llevar adelante parte del trabajo.

A los jurados, por sus aportes y correcciones de este trabajo.

A mis compañeros de la cátedra Métodos Complementarios de Diagnóstico, por compartir siempre sus conocimientos y por su acompañamiento cotidiano, por ser un grupo de excelentes personas, comprometidas con la educación y la mejora de la profesión, lo que hace que sea un orgullo formar parte del equipo. Principalmente a Daniel Arias por confiar en mí, por impulsar el crecimiento de quienes nos incorporamos. Por compartir sus proyectos y sueños de una facultad y un país mejor, y por generar las posibilidades para que cada uno pueda aportar su granito de arena.

A cachito, por enseñarme a realizar mis primeros informes radiográficos y por acompañarme en las primeras ecografías; por su generosidad al compartir sus conocimientos y por su infinita paciencia.

A Pablo por su ayuda desinteresada, por estar siempre dispuesto a resolver las dudas y guiarnos desde su experiencia.

A mi amiga Anaía, por ser parte de las anécdotas más felices de esta etapa y por estar siempre dispuesta a ayudarme.

A mis amigas, Pao y Anita, por su acompañamiento incondicional.

A todos los integrantes del Centro de Fisiología Reproductiva, principalmente a las becarias y estudiantes, quienes con gran responsabilidad y afecto, participaron en el mantenimiento de la colonia experimental felina.

A los propietarios de las mascotas integrantes del proyecto, quienes me confiaron el cuidado de parte de su familia.

A los animales que participaron en este trabajo y a los que día a día me motivan a seguir aprendiendo.

PUBLICACIONES PARCIALES DEL PRESENTE TRABAJO

CAPÍTULO I

Resúmenes presentados en congresos internacionales y nacionales

- Vercellini R, Gobello C, Mendoza P, Olguin S, Czernigow M, Arias D, Blanco PG. Prepubertal ovarian and uterine ultrasonographic changes in bitches. In Proceedings Book: 23rd EVSSAR Congress 3-4 de Octubre de 2021. Atenas, Grecia.
- Vercellini R, Gobello C, Mendoza P, Rubé A, Batista PR, Barrón JP, Blanco PG. Evaluación ultrasonográfica de la morfología y perfusión ovárica y uterina en perras antes y durante la pubertad. Memorias del XXI Congreso Nacional de AVEACA. 23-24 de Septiembre 2021. Buenos Aires, Argentina.

CAPÍTULO II

Publicaciones en revistas internacionales

- Vercellini R, Gobello C, D'Francesco E, Olguin S, Arizmendi A, Rodríguez R, Arias DO, Blanco PG. (2018). Ultrasonographic evaluation of ovarian morphology and blood flow in prepubertal and pubertal cats. *Reprod Dom Anim.* 53 Suppl 3:74-78.

Resúmenes presentados en congresos internacionales y nacionales

- Vercellini R, Gobello C, D'Francesco E, Olguin S, Arizmendi A, Rodríguez R, Arias D, Blanco PG. Ultrasonographic evaluation of ovarian morphology and blood flow in prepubertal cats: preliminary report. In Proceedings Book: XXth EVSSAR Congress. 29 junio-1 Julio de 2017. Vienna, Austria. Pp 68.
- Vercellini R, Gobello C, D'Francesco E, Olguin S, Borja Noriega C, Fernández C, Arias S, Blanco PG. Evaluación ultrasonográfica de la morfología y perfusión ovárica en gatas antes y durante la pubertad. 10ma Jornada Internacional de Veterinaria práctica. 25 y 26 de Agosto de 2017. Mar del Plata, Argentina.

CAPÍTULO III

Publicaciones en revistas internacionales

- Vercellini R, Blanco PG, Arizmendi A, Díez M, Rodríguez R, Gobello C. (2021). Ovarian and uterine two-dimensional and Doppler

ultrasonographic changes in the feline pre-estrus period. *Journal of feline medicine and surgery*. doi:10.1177/1098612X211067016

Resúmenes presentados en congresos internacionales y nacionales

- Vercellini R, Gobello C, Di Francesco E, Barréná P, Batista PR, Rodríguez R, Blanco PG. Ultrasonographic evaluation of ovarian morphology and blood flow during feline estrous cycle. En *Proceedings Book: 21st EVSSAR Congress*. 22-23 de Junio de 2018. Venecia, Italia. Pp 164.
- Vercellini R, Batista P, Ré N, López Knudsen I, Olguin S, Blanco PG. Evaluación ultrasonográfica de la morfología y perfusión ovárica durante el ciclo estral felino. Congreso AVEACA. 4 y 5 de Octubre 2018, Buenos Aires, Argentina.

CAPÍTULO IV

Resúmenes presentados en congresos internacionales y nacionales

- Vercellini R, Gobello C, Ré N, Rodríguez R, Arás D, Blanco PG. Growth plates closure time in small-sized puppies. En *Proceedings Book: EVDI Online Congress* 23-24 de Septiembre de 2021. Maastricht, Países Bajos. Pp 66.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS:	1
RÉSUMÉN:	2
SUMMARY:	4
INTRODUCCIÓN GENERAL:	6
CAPÍTULO I: Evaluación ecográfica bidimensional y Doppler durante la pubertad en hembras caninas:	17
CAPÍTULO II: Evaluación ecográfica bidimensional y Doppler durante la pubertad en hembras felinas:	37
CAPÍTULO III: Cambios ultrasonográficos bidimensionales y Doppler de los ovarios y útero felinos en el periestro:	53
CAPÍTULO IV: Cronología del cierre fistular en caninos de razas pequeñas y su relación con la pubertad:	72
CONCLUSIONES FINALES:	87

ABREVIATURAS

ANOVA: análisis de varianza

CL: cuerpo lúteo

cm: centímetros

EEM: error estándar de la media

FFD: flujo de fin de diástole

IR: índice de resistencia

Kg: Kilogramos

MHz: Megahertz

mm: milímetros

VPS: velocidad de pulsos sistólicos

EVALUACIÓN ULTRASONOGRÁFICA DEL APARATO REPRODUCTOR EN HEMBRAS CANINAS Y FELINAS EN LA PUBERTAD Y RADIOGRÁFICA DE LOS CARTÍLAGOS DE CRECIMIENTO EN CANINOS

Palabras clave: Ultrasonografía Doppler; Radiografía; Pubertad; Caninos; Felinos.

Resumen

Los objetivos del presente trabajo de tesis fueron: reportar con ultrasonografía en modo B y Doppler los cambios ováricos y uterinos durante la pubertad canina; describir con ultrasonografía en modo B y Doppler los cambios ováricos y uterinos durante la pubertad felina; comparar las características ultrasonográficas bidimensionales y Doppler de ovarios y útero en gatas pospubéres durante las distintas fases del ciclo estral; determinar el momento de cierre fisario en los huesos del esqueleto apendicular en caninos de talla pequeña y analizar la relación entre el cierre de los cartílagos fisarios y la pubertad. Para las evaluaciones ultrasonográficas se utilizaron 8 perras prepúbéres y 16 gatas, de las cuales 9 fueron prepúbéres y 7 pospubéres. Se realizaron evaluaciones ultrasonográficas en modo B y Doppler color y pulsado de los ovarios y útero durante su desarrollo puberal y en las hembras felinas adultas, durante un ciclo estral anovulatorio. Adicionalmente, se evaluaron mensualmente 12 perros mediante radiografías simples, desde los 3 a los 12 meses de edad. Durante la pubertad canina y felina, se identificaron cambios morfológicos y de flujo sanguíneo en los ovarios y útero a través del uso de ultrasonografía B y Doppler. En ambas especies, se evidenció

el aumento del tamaño ovárico y uterino, como así también del número y tamaño de estructuras folículos hacia el primer celo. Dichos cambios fueron acompañados por aumento en el flujo sanguíneo, evidenciado por una disminución en el IR de las arterias intraováricas y uterinas. En gatas postpúbères, también se documentaron cambios morfológicos y vasculares de los ovarios y útero a lo largo del ciclo estral anovulatorio. Se reportó por primera vez la cronología del cierre fistular en caninos de talla pequeña mediante radiografías y fue posible determinar la influencia de la pubertad sobre algunas de las fistis evaluadas.

ULTRASONOGRAPHIC EVALUATION OF THE REPRODUCTIVE TRACT IN CANINE AND FELINE FEMALES AT PUBERTY AND RADIOGRAPHIC EVALUATION ON THE GROWTH PLATES IN SMALL DOGS

Keywords: Doppler Ultrasound, Radiology, Puberty, Dogs, Cats

Summary

The aim of this Thesis were: To describe two-dimensional and Doppler ultrasonographic changes of canine ovary and uterus before and during puberty; to describe two-dimensional and Doppler ultrasonographic changes of feline ovary and uterus before and during puberty; to compare the two-dimensional and Doppler ultrasonographic characteristics of the ovaries and uterus in postpubertal cats during anovulatory estrous cycles; to determine the age of physical closure of the appendicular skeleton in small dogs and to analyze the influence of puberty on the physical closure. For the ultrasonographic evaluations, 8 prepubertal female dogs and 16 female cats were recruited, including 9 prepubertal and 7 postpubertal cats. Two-dimensional and Doppler ultrasonographic evaluations of the ovaries and uterus were carried out in both species during their pubertal development and in postpubertal anovulatory cycles in cats. Finally, 12 dogs were radiographically evaluated every month, from 3 to 12 months of age. During canine and feline puberty, morphological and blood flow changes were described in the ovaries and uterus by B and Doppler ultrasonography. In both species, the increase in ovarian and uterine size was evidenced, as well as in the number and size of follicular structures towards the first estrous cycle. These changes were accompanied by an increase in blood flow, evidenced by a decrease in the IR of

the intraovarian and uterine arteries. In postpubertal cats, morphological and vascular changes of the ovaries and uterus were also documented throughout the oestrous cycle. The chronology of physal closure was reported, for the first time, in small-sized dogs and the effect of puberty could be detected in some physes.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La pubertad es el proceso fisiológico durante el cual un mamífero se convierte en un adulto capaz de reproducirse (Gobello, 2014). Es un proceso gradual que se caracteriza por la aparición de numerosos cambios cuantitativos y no un fenómeno agudo (Marshall y Tanner, 1969). Es importante resaltar que la pubertad es además un proceso de transición y no un hito aislado en la vida de un animal. Sin embargo, en perros y gatos no se han descrito la totalidad de cambios morfológicos que caracterizan este periodo y menos aún se han podido definir estados que den cuenta de la gradualidad de este proceso fundamental para la función reproductiva. El desarrollo puberal es un proceso complejo, influenciado por numerosos factores, como los genéticos, nutricionales, variaciones por sexo, por edad, por fotoperíodo, entre otros. La importancia de cada uno de estos factores a su vez varía según la especie involucrada, por lo que se debe tener en cuenta a la hora de evaluar esta etapa de la vida de un animal.

En otras especies como la humana, la determinación del inicio y evolución de la pubertad se evalúa con la aparición de caracteres sexuales secundarios en combinación con cambios en las dimensiones de determinados órganos del aparato reproductor, como las mamas y los testículos en mujeres y varones, respectivamente (Becut y Ghizzoni, 2000). En función de estos cambios se han podido establecer distintos estados en el periodo puberal humano (Marshall y Tanner, 1969; Marshall y Tanner, 1970). A su vez, a partir de la utilización de métodos complementarios de diagnóstico por imágenes, se obtiene mayor información sobre el grado de desarrollo de una forma no invasiva. Por ejemplo, el desarrollo esquelético de niños y adolescentes se evalúa a partir de la aparición

de la fisis y los huesos de la mano y carpo, que guarda relación con los estados puberales de Tanner (Gilsanz y Rubin, 2005). Asimismo, en humanos se han realizado estudios reproductivos por ultrasonografía bidimensional y Doppler que han permitido establecer los distintos estados puberales (Ivarsson y col, 1983; Battaglia y col, 2003). Incluso se ha identificado que las modificaciones morfológicas de los ovarios y útero ocurren antes que los cambios clínicos típicos de la pubertad (Holm y col, 1995). La evaluación ultrasonográfica del útero y ovarios ha demostrado ser una técnica de alta sensibilidad y especificidad en la diferenciación entre la telarquia prematura y la pubertad central precoz en humanos (Becchi y Ghizzoni, 2000; de Vries y col, 2006).

En la especie bovina, se han identificado varios factores involucrados en el inicio de la pubertad (Day, 2015), lo que ha permitido implementar distintas herramientas de manejo con respecto al momento del primer servicio (Patterson y col, 1992; Gasser, 2013). A su vez, en vacas y cerdas, la ultrasonografía es utilizada para determinar el grado de desarrollo sexual del animal (Monteiro y col, 2013; Perry y Cushman, 2016; Kauffold y col, 2004). En cerdas, esta técnica permite seleccionar las hembras con mayor madurez, para ser incluidas en forma temprana al circuito reproductivo (Martinat-Botté y col, 2011).

En las hembras carnívoras, la ultrasonografía bidimensional y Doppler es un método diagnóstico que se ha aplicado en la evaluación reproductiva durante años (Blanco y col, 2008; Scott y col, 2008). Con respecto a la perfusión del aparato reproductivo, se han llevado a cabo mediciones de velocidad e índice de resistencia de los vasos uterinos en perras en anestro y durante la preñez normal, periodo en el cual el flujo sanguíneo se incrementa significativamente (Nautrup,

1998; Di Salvo y col, 2006). Asimismo, estos parámetros vasculares se han evaluado durante el aborto canino espontáneo (Blanco y col, 2014) e inducido farmacológicamente (Blanco y col, 2009), mostrando las variaciones circulatorias que permiten predecir la ocurrencia de este trastorno. En la gata, se ha descrito también un aumento del flujo sanguíneo uterino durante la gestación normal y su posterior descenso en el puerperio (Blanco y col, 2014; Blanco y col, 2015). También se han reportado los cambios circulatorios en gatas con piometra o aborto inducido farmacológicamente (Blanco y col, 2016; Blanco y col, 2018). Sin embargo, se desconocen los cambios morfológicos y de perfusión uterina y ovarica durante la pubertad canina y felina. Resulta de gran interés conocer en detalle las características anatómicas y funcionales de los órganos reproductivos antes, durante y luego de la pubertad en perras y gatas para comprender en profundidad las particularidades del desarrollo reproductivo de estas especies. Si, como en los humanos, vacas y cerdos, se producen cambios paulatinos en el tamaño y perfusión del útero y ovarios, conocerlos en detalle permitirá diagnosticar cualquier trastorno en el proceso de desarrollo puberal normal.

En otras especies domésticas, uno de los factores más determinantes de la aparición de la pubertad es el crecimiento, es decir, el aumento de tamaño de un animal a lo largo de su vida posnatal. La pubertad y el crecimiento son dos procesos vinculados por interacciones mutuas mediadas por diferentes factores endocrinos o parácrinos en diferentes niveles anatómicos (Bourguignon, 1991; Stamos y Boscos, 2001; Schäfer-Somi y col, 2014). El peso corporal es un factor crítico para el desarrollo sexual. En los felinos, se ha reportado que la pubertad se alcanza con un 75% de su peso adulto (Stamos y Boscos, 2001). El crecimiento

en longitud de los huesos largos se produce en los cartílagos fisearios y su cierre determina la finalización del crecimiento en altura del animal, es decir, su altura adulta (Pinés y Nurwitz, 1991). Debido a que este cierre es influenciado por hormonas sexuales, se lo ha relacionado con el inicio de la pubertad en distintas especies (Kilborn y col, 2002; Rogol y col, 2002; Nilsson y Baron, 2004; Shim, 2015). La radiografía es el método complementario de primera elección para evaluar el tejido óseo. En un animal en crecimiento, esta técnica permite observar variaciones en la forma y tamaño de los huesos, así como la ossificación de los cartílagos de crecimiento (Koné, 1998). En la especie felina, se ha reportado la cronología de los cierres fisearios (Smith, 1969), y se ha estudiado el impacto que tiene la castración en este cierre (May y col, 1991; Root, 1997).

En la especie canina, existen numerosas diferencias genéticas entre las distintas razas. Por este motivo, el momento de aparición y la duración de la pubertad pueden variar entre una raza canina y otra, o incluso entre una línea familiar y otra dentro de la misma raza (Forsberg, 2012). En el caso de los caninos, no se ha establecido para cada raza la influencia de factores como la tasa de crecimiento o el porcentaje de peso adulto en la pubertad. Existe solo un reporte en perros machos Beagle (Taha, 1981) y otro en hembras de razas Beagle y Labrador, donde se evaluó el comportamiento, niveles hormonales y actividad ovárica mediante laparoscopia durante el primer celo (Wlat y col, 1981). A su vez, los estudios sobre desarrollo óseo han sido reportados principalmente en razas grandes y gigantes (Riser y Shirer, 1965; Sumner-Smith, 1966; Nap y col, 1991; Castillo y col, 1997), pero se desconoce lo que sucede en razas pequeñas específicamente. Sería de suma utilidad contar con rangos de edades de cierre fiseario en

poblaciones de perros de tamaño pequeño, para aplicar en la consulta radiológica de rutina.

Como consecuencia del escaso conocimiento sobre el desarrollo puberal en pequeños animales, se presentan distintos interrogantes. Por un lado, el diagnóstico erróneo de alteraciones reproductivas tempranas en algunas hembras (falta de aparición del primer celo, ausencia de preñez) en ocasiones se realiza antes de que las mismas se desarrollen sexualmente. Esto sucede por la dificultad de establecer en cada animal, el inicio y la duración normal de la pubertad. Y menos aun se ha establecido en carnívoros domésticos, la posibilidad de que existan, como en humanos, etapas fisiológicas de la pubertad que no deberían ser confundidas con desórdenes reproductivos (Mac Lean, 2000). Adicionalmente, para implementar métodos contraceptivos se requiere de la determinación del momento de aparición del primer celo, no siempre detectable con facilidad. Tampoco existen en carnívoros domésticos recomendaciones que contraindiquen el servicio en una hembra púber, ni se conoce el efecto que la gestación puede tener en una hembra preñada antes del cierre fisario de sus huesos largos.

Por todo lo expuesto, el objetivo general del presente trabajo de tesis fue analizar los cambios ultrasonográficos ováricos y uterinos de hembras carnívoras domésticas y radiológicos de los cartílagos de crecimiento en caninos durante la pubertad. Para alcanzar dicho objetivo general, los objetivos particulares fueron:

1. Reportar con ultrasonografía en modo B y Doppler los cambios ováricos y uterinos durante la pubertad canina.
2. Describir con ultrasonografía en modo B y Doppler los cambios ováricos y uterinos durante la pubertad felina.

3. Comparar las características ultrasonográficas bidimensionales y Doppler de ovarios y útero en gatas pospuberales durante las distintas fases del ciclo estral.
4. Determinar el momento de cierre fistula en cáninos domésticos de talla pequeña antes y durante la pubertad.

Bibliografía

1. Battaglia C, Mancini F, Regnani G, Persico N, Iughetti L, De Alais D. Pelvic ultrasound and color Doppler findings in different sexsual precocities. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2003; 22: 277-283.
2. Blanco PG, Arias DO, Gobello C. Doppler ultrasound in canine pregnancy. *J Ultrasound Med.* 2008; 27:4745-50.
3. Blanco PG, Arias D, Rubé A, Barrera JP, Corrada Y, Gobello C. An experimental model to study index and systolic/diastolic ratio of uterine arteries in adverse canine pregnancy outcome. *Reprod Dom Anim.* 2009; 44:164-166.
4. Blanco PG, Rodríguez R, Rubé A, Arias DO, Tortora M, Díaz JD, Gobello C. Doppler ultrasonographic assessment of maternal and fetal blood flow in abnormal canine pregnancy. *Anim Reprod Sci.* 2011; 126:130-5.
5. Blanco PG, Rodríguez R, Olguin S, Rubé A, Tortora M, Gobello C. Doppler ultrasonographic assessment of maternal and fetal arteries during normal feline gestation. *Anim Reprod Sci.* 2014; 146:63-9.

6. Blanco PG, Rodríguez R, Batista PR, Barrera JP, Arias DO, Gobello C. Bidimensional and Doppler ultrasonographic evaluation of postpartum uterine involution in the queen. *Theriogenology*. 2015; 84:82-85.
7. Blanco PG, Vercellini R, Rubé A, Rodríguez R, Arias DO, Gobello C. Evaluation of feline uterine and umbilical arteries blood flow in a pharmacologically induced abnormal gestation model. *Theriogenology*. 2016; 86:2323-27.
8. Blanco PG, Rubé A, López Mérito M, Batista PR, Arias S, López Knudsen I, Tortora M, Gobello C. Uterine two-dimensional and Doppler ultrasonographic evaluation of feline pyometra. *Reprod Dom Anim*. 2018; 53:70-73.
9. Beccuti G, Ghizzoni E. Normal and abnormal puberty. In: De Groot LJ, Beck-Przydosz P, Chrousos G, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MD Text.com, Inc.; 2000. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279024/>
10. Bourguignon JP. Growth and timing of puberty: reciprocal effects. *Norm Res*. 1991; 36:131-135.
11. Casullo V, Márquez A, Rodríguez M, Lalla J. Parámetros bioquímico-endocrinos de utilidad en la etapa del crecimiento y desarrollo del Ovejero Alemán, Doberman y Gran Danés. *Arch Méd Vet*. 1997; vol 29.
12. Day ME. Nutritional Effects on Beef Heifer Development, Puberty and Subsequent Reproduction. In *Proceedings of the 2015 Florida Ruminant Nutrition Symposium* (p. 69).
13. de Vries L, Horv G, Schawitz M, Phillip M. Ultrasonographic and clinical parameters for early differentiation between precocious puberty and premature thelarche. *Eur J Endocrinol*. 2006; 154:891-8.

14. Di Sálvo P, Bocca E, Zelli R, Polisca A. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in the bitch. *Res Vet Sci*. 2006; 81:382-388.
15. Forsberg CL. Biology of reproduction of the dog and modern reproductive technology. In: *The Genetics of the dog*, 2nd Ed. 2012; Eds Östrandér and A. Ruvinsky, p. 295-314.
16. Gasser CL. Considerations on puberty in replacement beef heifers. *J Anim Sci*. 2013; 91:1336-1340.
17. Gilsanz, V. and Rauh, O. (2005) *Hand Bone Age, a Digital Atlas of Skeletal Maturity*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 96 pp.
18. Gobbels C. Prepubertal and Pubertal Canine Reproductive Studies: Conflicting Aspects. *Reprod Dom Anim*. 2014; 49:e70-e73.
19. Holm K, Mosfeldt Låursén E, Brocks V, Müller J. Pubertal maturation of the internal genitalia: as ultrasound evaluation of 166 healthy girls. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1995; 6:175-181.
20. Ivansson SA, Nilsson KO, Persson PH. Ultrasonography of the pelvic organs in prepubertal and postpubertal girls. *Arch Dis Child*. 1983; 58:352-354
21. Käuffold J, Rautenberg T, Richter A, Wächner M, Sobiraj A. Ultrasonographic characterization of the ovaries and the uterus in prepubertal and pubertal girls. *Theriogenology*. 2004; 61:1635-1648.
22. Kilbom SN, Trudel G, Uthoff N. Review of Growth Plate Closure Compared with Age at Sexual Maturity and Lifespan in Laboratory Animals. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2002; 41:21-26.
23. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the Pattern of Pubertal Changes in Boys. *Arch Dis Child*. 1970; 45:13-23.

24. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the Pattern of Pubertal Changes in Girls. *Arch Dis Child.* 1969; **44**:291-303.
25. Marinat-Botté E, Ventur E, Royer E, Elleboud E, Furstoss V, Rémont B, Drancourt MA. Selection of impubertal girls by ultrasonography optimizes their oestrous, ovulatory and fertility responses following puberty induction by PG600. *Anim Reprod Sci.* 2011; **132**:137.
26. Mays C, Bennett D, Downham DY. Delayed physical closure associated with castration in cats. *J Small Anim Pract.* 1991; **32**:326-328.
27. McLean M, Davis AJ, Rennollar RN. Abnormalities of Female Pubertal Development. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278950/>
28. Monteiro EM, Mercadante MEZ, Barros CM, Sátrápá RA, Silva JAV, Oliveira LZ, Sátrápá NZ, Oliveira CS, Garcia JM. Reproductive tract development and puberty in two lines of Nelore heifers selected for postweaning weight. *Theriogenology.* 2013; **80**:10-17.
29. Nap R, Hakewinkel HAW, Voorhout G, Van der Brom WE, Goedegebure SA, Van T Klooster ATH. Growth and Skeletal Development in Great Dane Pups Fed Different Levels of Protein Intake. *J Nutr.* 1991; **121**:S107-113.
30. Nautrup CP. Doppler ultrasonography of canine maternal and fetal arteries during normal gestation. *J Reprod Fertil.* 1998; **112**:301-14.
31. Nilsson O, Baron J. Fundamental limits on longitudinal bone growth: growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Trends Endocrinol Metab.* 2004; **15**:370-374.

32. Patterson DJ, Perry RC, Kräcsofö GH, Bellows RA, Stangmiller RB, Corahg ER. Management Considerations in Neuter Development and Puberty. *J Anim Sci.* 1992; 70:4018-4035.
33. Perry GA, Cushman RA. Invited Review: use of ultrasonography to make reproductive management decisions. *Prof Anim Sci.* 2016; 32:154-161.
34. Pines M, Nurrwitz S. The Role of the Growth Plate in Longitudinal Bone Growth. *Poultry Science.* 1991; 70:1806-1814.
35. Riser W, Shrier JE. Normal and abnormal growth of the distal foreleg in large and giant dogs. *Vet Radiol Ultrasonol.* 1965; 6: 50-64.
36. Rogol AD, Roemmich JN, Clark PA. Growth at Puberty. *J Adolesc Health.* 2002; 31:192-200.
37. Root Kustritz MV. Determining the optimal age of gonadectomy of dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc.* 2007; 231:1665-75.
38. Shim KS. Pubertal growth and epiphyseal fusion. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2015; 20:8-12.
39. Smith, RN. Fusion of ossification centers in the cat. *J Small Anim Pract.* 1969; 10:523-530.
40. Schäfer-Somi S, Kaya D, Güllük N, Aslan S. Suppression of fertility in pre-pubertal dogs and cats. *Reprod Dom Anim.* 2014; 49:21-27.
41. Scott L, Di Salvo P, Bocci E, Pieramati C, Polisca A. Doppler evaluation of maternal and foetal vessels during normal gestation in queen. *Theriogenology.* 2008; 69:1111-9.
42. Stambou A, Boscós C. The estrous cycle of the domestic cat. *J Hellen Vet Med Soc.* 2001; 1:339-346.

43. Sumner-Smith G. Observations on epiphyseal fusion of the canine appendicular skeleton. *J Anim Pract.* 1966; **7**: 303-311.
44. Taha MA, Nokes DE, Allen WE. Some aspects of reproductive function in the male Beagle at puberty. *J Small Anim Pract.* 1981; **22**:663-667.
45. Kondé EJ. Diseases of the immature skeleton. In: Thrall DE (ed.). *Textbook of veterinary diagnostic radiology*. 3rd Ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1998, pp. 131-141.
46. Wlat DE, Seager SWJ, Chakraborty PK. Behavioral, ovarian and endocrine relationships in the pubertal bitch. *J Anim Sci.* 1981; **53**:182-191.

Capítulo I

EVALUACIÓN ULTRASONOGRÁFICA BIDIMENSIONAL Y DOPPLER DURANTE LA PUBERTAD EN HEMBRAS CANINAS

Introducción

El proceso de desarrollo que lleva a la pubertad se basa en una extraordinariamente compleja serie de eventos interrelacionados (Gobello, 2014).

El peso corporal, un parámetro importante que influye en el inicio de la pubertad, es un reflejo del crecimiento que, a su vez, es dependiente del género y la nutrición. Entre los animales domésticos, los perros son únicos en su enorme diferencia de tamaño intraspecie, existiendo ejemplares con un peso menor a 1,5 kg y otros que pueden superar los 100 kg.

El inicio de la pubertad en hembras caninas ocurre entre los 8 y 12 meses de edad, con un rango entre 4 y 22 meses. La amplia variación en la edad cronológica hace que no sea un parámetro único para determinar el grado de desarrollo sexual de un animal, debido a los otros factores que influyen en este proceso, como la raza y el peso (Johnston y col, 2001; Wilf y col, 1981; Forsberg, 2007). Esto le da a la pubertad canina un mayor grado de imprevisibilidad en comparación con otras especies.

Mientras la aplicación de la ultrasonografía bidimensional, es posible analizar de manera no invasiva y en tiempo real los cambios morfológicos que ocurren en los ovarios y el útero (Mättön, Nyländ, 1995). A su vez, la modalidad Doppler

permite evaluar múltiples procesos fisiológicos y patológicos en estos órganos a partir de los cambios en la dinámica vascular (Sing y col., 2003; Günther, 2014). La aplicación de este método de diagnóstico para la evaluación del grado de desarrollo de un animal ha sido descrita en otras especies domésticas. Se reportó que la aplicación ultrasonográfica de los ovarios facilitó el diagnóstico de madurez sexual en vacas (Nonararaboz 2004; Perry & Cushman, 2016) y cerdas prepubéres (Martínat-Botté y col., 2003; Kauffold y col., 2004).

En perras, la ultrasonografía bidimensional y Doppler ha sido utilizada exitosamente en animales adultos sanos para evaluar el ciclo estral, la gestación y el puerperio (Koster y col., 2001; Polisca y col., 2013; Di Salvo y col., 2006; Băuștă y col., 2013). Asimismo, ha sido utilizada para evaluar la dinámica folicular y la ovulación en esta especie (England y col., 2009; Bergeron y col., 2013; Hirata y col., 2018).

Sin embargo, a pesar de la importancia de conocer en profundidad el desarrollo sexual de la perra, no se han reportado aún las modificaciones del tracto reproductivo de las hembras caninas antes y durante la pubertad. Esto puede llevar a errores diagnósticos como infertilidad en perras que aún no han completado su madurez sexual, o al desconocimiento del momento óptimo para comenzar la cría o iniciar tratamientos contraceptivos que pospongan el celo (Schäfer-Somi y col., 2014). Por estas razones, el objetivo de este experimento fue evaluar mediante ultrasonografía bidimensional y Doppler los cambios ováricos y uterinos antes y durante la pubertad canina.

Materiales y métodos

Animales

En este estudio se incluyeron 8 perras sanas, 6 mestizas y 2 Dáchsund, de 3 meses de edad, de 3.3 ± 0.42 (1.2-4.9) kg de peso. Las perras vivían con sus propietarios, pertenecían a diferentes camadas, fueron desparasadas a los 40-45 días de edad y alimentadas con alimento seco comercial *premium* y agua *ad libitum*. Se les realizó un hemograma completo, bioquímica sérica y una ecografía ginecológica para asegurar el buen estado de salud. Este estudio fue aprobado por el Comité de Cuidado y Uso Animal de esta Institución y todos los protocolos experimentales se realizaron bajo las pautas establecidas en las Guías para el cuidado y uso de los animales de experimentación (IACUC N° 56-2-16F).

Seguimiento

Las perras fueron evaluadas clínicamente y ultrasonográficamente una vez por mes y diariamente por los tutores entrenados para identificar signos de proestro, como descarga vulvar sanguinolenta y/o atracción del macho. A partir de la identificación del proestro, las hembras fueron evaluadas diariamente mediante citología vaginal. El inicio de la pubertad (día 1 del estró) fue definido por la primera aparición de 90% de células superficiales del epitelio vaginal y comportamiento típicos (Johnston y col., 2004).

Evaluaciones ultrasonográficas

Las evaluaciones ultrasonográficas en modo B y Doppler color y espectral de los ovarios y útero fueron realizadas los días -140, -90, -60, -30 y 20, utilizando un transductor lineal de 14 MHz (Toshiba Nemio XG, Japón). Los días de evaluación fueron determinados retrospectivamente. Los animales fueron posicionados en decúbito dorsal o sentados sobre el regazo del operador, sin el uso de sedación o anestesia. Sobre la piel rasurada, se aplicó gel para lograr un adecuado acoplamiento acústico. Los ovarios fueron identificados cerca del polo caudal del respectivo riñón, mientras que el útero se localizó entre la vejiga y el colon (Davidson y Baker, 2009). En cada evaluación se realizaron mediciones del diámetro longitudinal y transversal de los ovarios (mm). Se consideró como folículo antral a aquellas estructuras esféricas y anecoicas >1 mm (Figura 1), mientras que aquellas estructuras esféricas hipocóicas o con paredes gruesas y con cavidad fueron consideradas cuerpos lúteos (CL; England y col., 2009; Davidson y Baker, 2009; Figura 2). En cada ovario, fue registrado el tamaño y el número de folículos y CLs. A su vez fue registrado el diámetro máximo (mm) de los folículos y CLs más grandes.

Se documentó el aspecto ultrasonográfico del útero, su ecogénicidad, la presencia de capas uterinas, la presencia de contenido luminal y el diámetro transversal (mm) del cuerpo uterino.

Para la evaluación ovárica con modalidad Doppler, las arterias intravariáticas derecha e izquierda fueron localizadas dentro del tejido ovárico utilizando Doppler color. El tamaño de la caja de Doppler color fue limitada a la máxima extensión del ovario, además el filtro y la ganancia fueron ajustados en cada evaluación para obtener imágenes óptimas. Con el Doppler pulsado se obtuvo el

trazado espectral del flujo arterial (Koster y col, 2001; Figura 3). Para la evaluación uterina con modalidad Doppler, se utilizó ultrasonografía bidimensional en modo B para identificar el cuerpo uterino en un corte transversal. Las arterias uterinas derecha e izquierda adyacentes al cuerpo uterino fueron localizadas utilizando Doppler color y con Doppler pulsado se obtuvieron los trazados espectrales (Koster y col, 2001; Figura 4). Para disminuir la variabilidad, se registraron 3 ondas uniformes y consecutivas por un único operador entrenado (RV). Se midieron la velocidad de pico sistólico (VPS; m/s) y el flujo de fin de diástole (FFD; m/s) de las arterias intraováricas y uterinas derecha e izquierda, para calcular el índice de resistencia (IR) automáticamente como $(VPS-FFD)/VPS$ (Blanco y col, 2008).

Análisis estadístico

Se corroboró la distribución normal de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk. Se compararon todos los parámetros bidimensionales y Doppler derechos e izquierdos mediante el test de Student. En ausencia de diferencias significativas ($p > 0,1$), los valores derechos e izquierdos fueron promediados. Luego, los datos se analizaron por ANOVA de medidas repetidas, seguido por Test de Tukey para determinar el efecto del tiempo sobre dichos parámetros (SPSS 18.0; SPSS, Chicago, IL, USA). Todas las variables fueron expresadas como su promedio \pm el error estándar de la media (EEM). Se consideró significativo un nivel de $p < 0,05$.

Resultados

Las hembras caninas alcanzaron la pubertad a los $10,5 \pm 0,5$ (8-13) meses de edad, pesando $9,3 \pm 1,8$ (3,9-17,9) kg, lo cual representó un $95 \pm 1,6$ % de su peso adulto.

En todas las imágenes bidimensionales, los ovarios se identificaron como estructuras ovales e hipocercas con respecto a los tejidos adyacentes. Los diámetros ováricos longitudinal ($p < 0,01$) y transversal ($p < 0,01$) aumentaron gradualmente durante el estudio, de $9,8 \pm 0,4$ y $5 \pm 0,2$ mm a $13,01 \pm 0,7$ y $7,8 \pm 0,5$ mm, respectivamente. Se detectaron folículos antrales por primera vez mediante ultrasonografía a los $5,7 \pm 0,6$ (3,7-7,5) meses de edad. En el transcurso del estudio, el número de folículos aumentó progresivamente de $1,1 \pm 0,2$ a $5,3 \pm 0,5$ ($p < 0,01$), mientras que el tamaño folicular se incrementó de $1,1 \pm 0,07$ a $3 \pm 0,2$ mm ($p < 0,01$). El diámetro folicular máximo se incrementó de manera marcada al día 1 ($p < 0,01$; Tabla 1).

Tabla 1. Variaciones en el número y diámetro de folículos ováricos de 8 perras sanas en su crecimiento hasta la pubertad (media \pm EEM)

Días de evaluación	Número de folículos	Diámetro promedio (mm)	Diámetro máximo (mm)
-140	$1,1 \pm 0,2^a$	$1,1 \pm 0,7^a$	$1,2 \pm 0,07^a$
-90	$1,7 \pm 0,3^{ab}$	$1,2 \pm 0,04^a$	$1,2 \pm 0,1^a$
-60	$1,7 \pm 0,2^{ab}$	$1,3 \pm 0,06^a$	$1,4 \pm 0,08^a$
-30	$2,7 \pm 0,2^b$	$1,4 \pm 0,03^a$	$1,9 \pm 0,1^a$
1	$5,3 \pm 0,5^c$	$3 \pm 0,2^b$	$4,1 \pm 0,3^b$

Las diferentes letras indican diferencias ($p < 0,01$) entre los días.

A medida que las perras se fueron aproximando al primer celo estral, el ovario se volvió más fácil de visualizar. En el día 20, todas las perras presentaban al menos un CE detectado mediante ultrasonografía. El número y tamaño de los CEs fueron $3,1 \pm 0,32$ y $4,6 \pm 0,57$ mm, respectivamente. El CE de mayor tamaño midió $5,8 \pm 0,72$ mm.

El cuerpo uterino se identificó como una estructura redondeada, hipocóica con respecto a los tejidos circundantes, homogénea, con un contorno hipercóico correspondiente a la serosa. Nada de la pubertad, en algunas de las perras, se observó un aumento en su ecogénicidad, con un útero isocóico con respecto a los tejidos circundantes y con ecotextura heterogénea. En casi todas las perras (7/8), en el estró y/o en el diestro, se detectaron ultrasonográficamente capas uterinas correspondientes al endometrio y miometrio. En 2 perras se observó la presencia de escaso contenido intraluminal hipocóico durante el celo y en otras 2, durante el diestro. El diámetro transversal uterino aumentó desde $4,2 \pm 0,2$ mm en el día -140 a $11,47 \pm 1,1$ en el día 1, y luego disminuyó a $7,9 \pm 0,7$ mm en el día 20 ($p < 0,01$).

La forma de onda del flujo sanguíneo intravárico y uterino del presente estudio se caracterizó por la presencia de un pico sistólico, seguido por la onda diastólica continua con la sístole y extendiéndose durante el resto del ciclo cardíaco con la siguiente sístole (Figura 3). Esta morfología no se modificó en el transcurso del experimento. Durante el estudio, la mayoría de las ondas uterinas presentaron una muesca diastólica, mientras que la mayor parte de las ondas de las arterias intraváricas no la presentaron (Figura 4). El IR de las arterias intraváricas y

úterinas disminuyó desde el inicio del estudio hacia el día 1, y luego aumentó hacia el día 20 ($p < 0,01$; Figura 5).

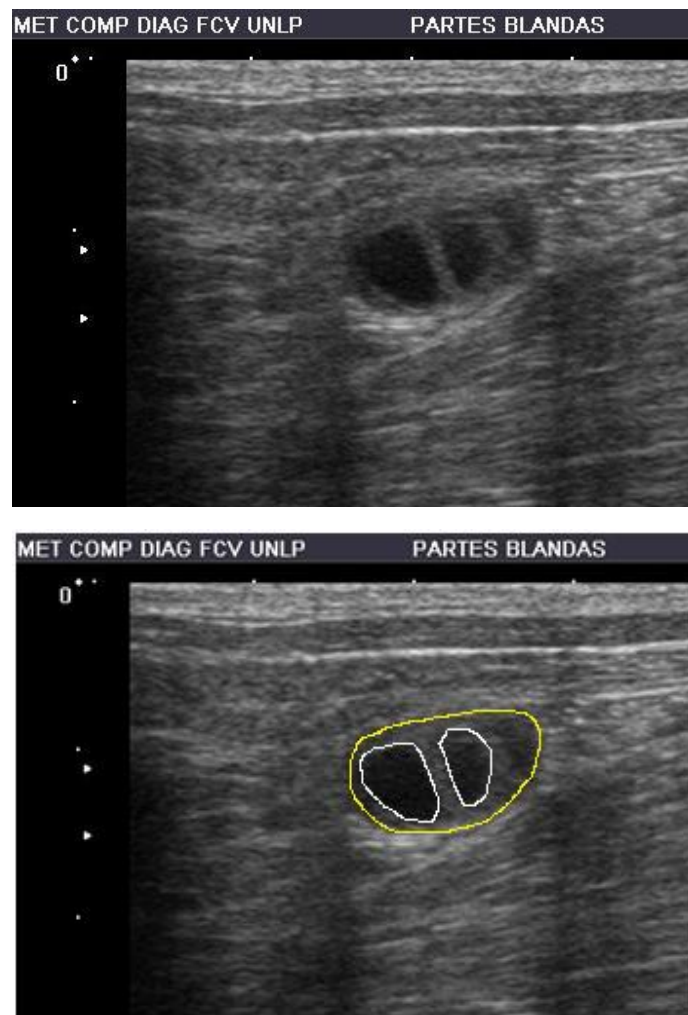


Figura 1. Imágen longitudinal del ovario izquierdo (delimitado con línea amarilla) de una hembra canina prepuber de 41 semanas de edad en la evaluación del día 1 (cél). Se observan dos estructuras anecoicas >1 mm de diámetro consideradas folículos (delimitados con líneas blancas).

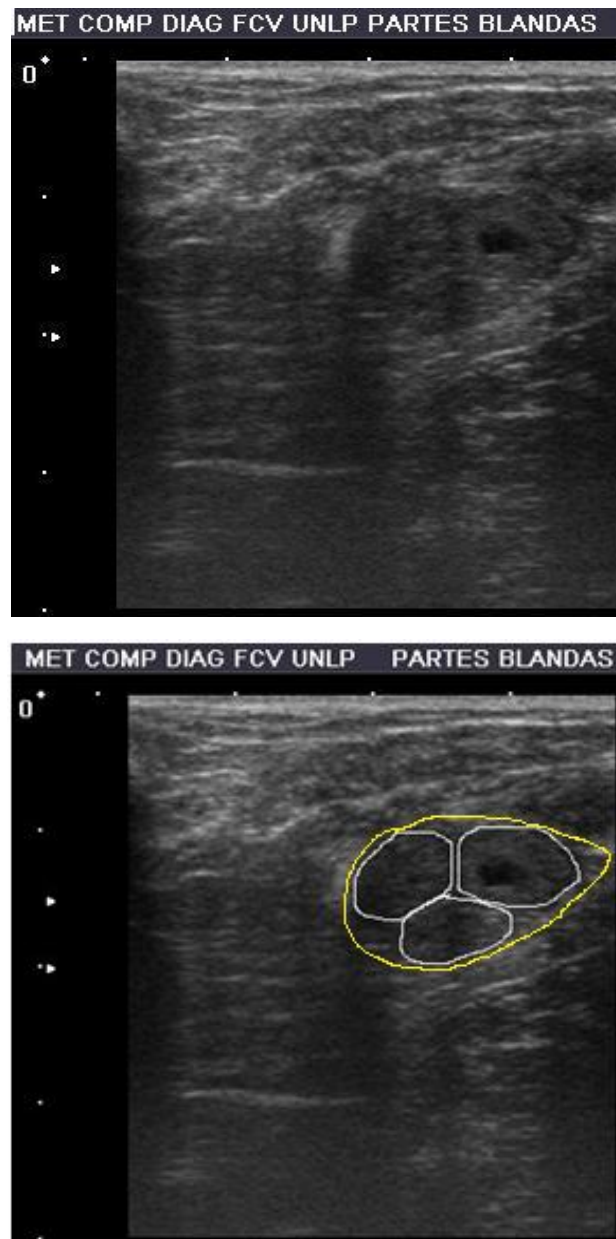


Figura 2. Imagen longitudinal del ovario izquierdo (delimitado con línea amarilla) de una hembra canina prepuber de 43 semanas de edad en la evaluación del día 20 (destró). Se observan tres estructuras cavitarias con pared >1 mm de espesor consideradas cuerpos lúteos (delimitados con líneas blancas).

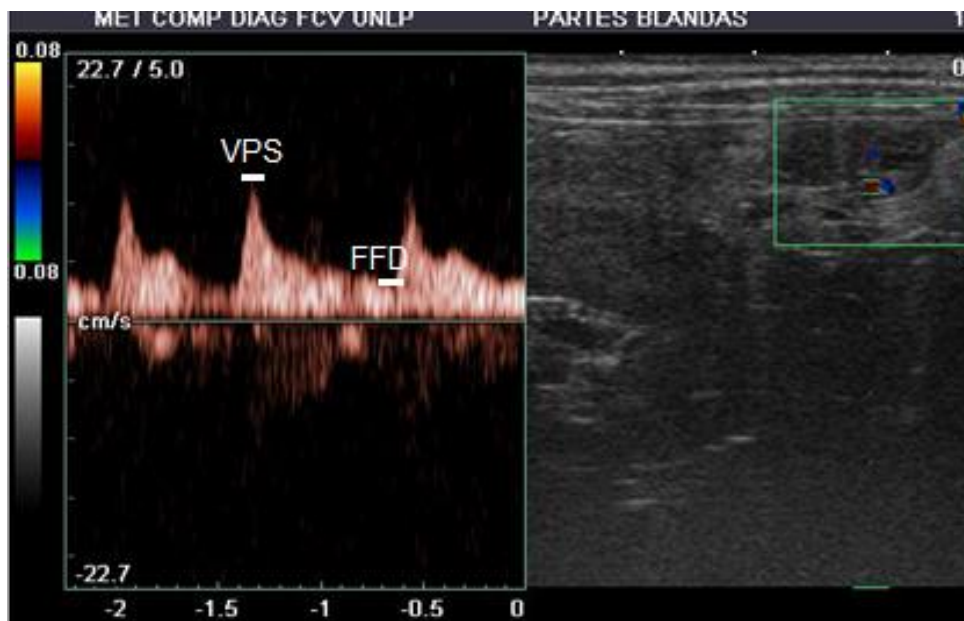


Figura 3. Ondă Doppler de arteră intraovărică de una hembra cârână prepuber de 42 săptămâni de vârstă. VPS: viteză de pînă la sistole; FFD: flux de fin de Diastole.



Figura 4. Ondă Doppler de la arteră uterină dreaptă de una hembra cârână prepuber de 21 săptămâni de vârstă. Flechă: mișcă Diastolică.

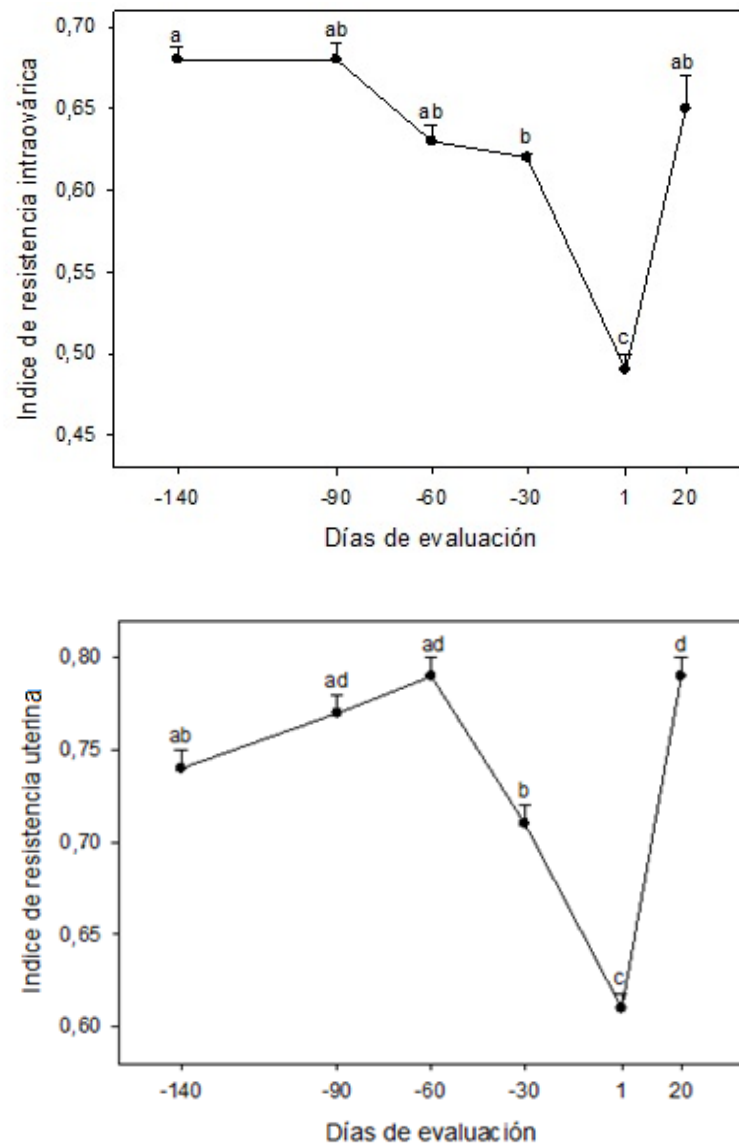


Figura 5. Índice de resistencia (media \pm EEM) de las arterias intraovárica (arriba) y uterina (abajo) de 8 hembras caninas evaluadas desde el día -140 hasta la pubertad (día 1). Las diferentes letras indican diferencias ($p < 0,01$) entre los días.

Discusión

Los resultados del presente capítulo constituyen el primer reporte sobre los cambios morfológicos y de flujo sanguíneo del ovario y útero como antes y durante la pubertad. En este estudio los tamaños de los ovarios y del cuerpo uterino fueron aumentando hasta llegar a la pubertad, alcanzando las medidas descritas en caninas adultas (Wallace y col., 1992; König y Dieblich, 2008). Este hallazgo concuerda con el aumento prepuberal en el tamaño gonadal y uterino reportado en mujeres (Laffan y col., 2018) vacas (Nonárámooszy col., 2004) y cerdas (Martinat-Botté y col., 2003; Kauffola y col., 2004).

A su vez, el aumento del tamaño ovárico fue acompañado de un aumento en el número y tamaño de estructuras foliculares hacia el primer ciclo estral del animal. Estos cambios concuerdan con lo descrito en cerdas y vacas donde existe una relación positiva entre el número de folículos antrales y el tamaño de los ovarios (Nonárámooszy y col., 2004; Lents y col., 2014). Es interesante destacar que, en el presente estudio, el número de folículos se incrementó significativamente 30 días antes de la ocurrencia del primer ciclo estral, por lo que se puede considerar que la detección ultrasonográfica de un aumento en la población folicular permitiría detectar la proximidad de la pubertad antes incluso de la aparición de signos clínicos de proestro.

En un estudio ultrasonográfico sobre dinámica folicular en perras pospuberes, England y col. (2009) describieron la presencia de folículos pequeños en el anestro tardío (100 días previos al pico de hormona luteinizante (LH) del ciclo subsiguiente, proponiendo que estos podrían llegar a ser los folículos reclutados

en el próximo ciclo (England y col., 2009). De forma análoga, en este estudio, detectamos pequeños folículos 141 ± 21 días previos al primer estró, los cuales fueron aumentando en número y tamaño hasta la pubertad.

En estas hembras, los primeros folículos antrales identificados mediante ultrasonografía fueron observados a los $5,7 \pm 0,6$ ($3,7-7,5$) meses de edad. Este hallazgo coincide con reportes histológicos en los cuales se describe que en la corteza ovárica se pueden encontrar folículos antrales los 120-160 días de vida en perras. Estos folículos continúan su crecimiento y se reportó que hasta los 6 meses de edad se encuentran folículos antrales >2 mm (Songsåsen y col., 2009). Es importante destacar dicho hallazgo en tanto se describe, en estudios previos, que es posible madurar oocitos *in vitro* a partir de folículos antrales, independientemente del estado en el que se encuentre la perra donante (prepuber, etapa folicular o anestro; Songsåsen y Wiket, 2005). Por este motivo resulta indispensable destacar la aplicación de la ultrasonografía en el desarrollo de tecnologías de la reproducción.

Los diámetros foliculares promedio hallados en el presente estudio durante el primer estró (día 1) coinciden con los tamaños reportados mediante ultrasonografía por otros autores (Wallace y col., 1992; Fontbonne y Malandain, 2006; England y col., 2009). Sin embargo, los diámetros máximos reportados en este estudio son ligeramente más pequeños: 4,1 mm vs 6 mm (Wallace y col., 1992), 6-9 mm (Fontbonne y Malandain, 2006) y >6 mm (England y col., 2009). Esto podría deberse a que en este estudio no se midieron los folículos preovulatorios sino que la evaluación fue realizada el primer día del estró. Esta diferencia de tamaño también podría deberse a la edad de las perras, ya que se ha

postulado que los folículos mayores a 4 mm se encuentran en menor cantidad en hembras caninas jóvenes (Gropetti y col., 2015). Este hallazgo también fue reportado en vacas, en donde los tamaños folículos máximos son más pequeños en hembras prepúberes que en adultas dentro de una misma raza (Evans y col., 1994).

Con respecto al útero, el cambio más destacable que ocurre hacia la pubertad es el aumento de su tamaño. Esto coincide con lo reportado en cerdas, en donde el área uterina evaluada ecográficamente aumenta rápidamente su tamaño hacia la pubertad (Martínat-Batté, 2003). A su vez, el aumento del tamaño uterino fue reportado en perras postpúberes durante el proestro, estró y diestro, debido a la influencia hormonal (de Freitas y col., 2017). Con respecto a su ecogénesis, los resultados coinciden con reportes en perras adultas, en donde se lo observa hipocóico en la mayoría de las evaluaciones y con ecogénesis heterogéneas durante el estró y diestro (Englund y Yeager, 1993; Davison y Baker, 2009). En el presente estudio, solo fue posible distinguir las capas del útero en estró y diestro, coincidiendo con los hallazgos reportados en perras adultas postpúberes (de Freitas y col., 2017). Esto podría deberse a factores hormonales característicos de cada momento del ciclo estral (Johnston y col., 2001). La presencia de escaso contenido hipocóico en la luz uterina fue descrita como hallazgo normal durante el estró y el diestro en perras adultas (Davison y Baker, 2009).

En este estudio, el aumento en número y tamaño de los folículos, como así también el tamaño uterino, fue acompañado por un aumento en el flujo sanguíneo de los órganos. La morfología de las ondas observadas en este estudio se caracterizó por presentar un pico sistólico, seguido del pico diastólico continuo.

Esta morfología coincide con lo observado en estudios previos en arterias uterina y ovariaca en distintos momentos del ciclo de perras adultas (Polisca y col, 2013; Barbosa y col, 2013; Freeman y col, 2013). Este patrón corresponde a las formas de onda tipo C definida por Dickey (1997) para la arteria uterina, que indica baja resistencia vascular. Esa disminución en la resistencia vascular ovariaca se vio evidenciada por un descenso en el IR. Este hallazgo concuerda con un estudio en cerdas prepuberiles donde se plantea que uno de los factores responsables del aumento del tamaño folicular es el incremento del flujo sanguíneo ovarico (Morbeck y col, 1992). A su vez, en otras especies, se ha descrito una asociación entre la angiogenesis ovariaca y el incremento del estrógeno plasmático (Forrest y col, 2010). En perras adultas, se observó el aumento gradual de la perfusión intravariaca desde el proestro hasta el periodo preovulatorio (Koster y col, 2001). En consonancia con estos hallazgos, se ha propuesto a la ultrasonografía Doppler como una herramienta para predecir la ovulación, en tanto permite detectar las modificaciones de flujo sanguíneo intravariaco próximas a este evento fisiológico (Bergeron y col, 2013; Barbosa y col, 2013). Finalmente, este hallazgo coincide con estudios en mujeres de entre 2 y 15 años, en donde el aumento del flujo sanguíneo uterino acompaña el desarrollo del órgano antes de la pubertad (Zerérsén y col, 2001). La disminución del IR hasta la pubertad demuestra la importancia de los cambios hemodinámicos asociados a la remodelación de los tejidos reproductivos, que acompañan las modificaciones morfológicas y fisiológicas del tracto reproductivo de la hembra.

Se concluye que, en hembras caninas, las dimensiones de los ovarios y del útero, el número y tamaño de los folículos y el flujo sanguíneo intravariaco y uterino

7. Dickey RP. Doppler ultrasound investigation of uterine and ovarian blood flow in infertility and early pregnancy. *Hum Reprod Update*. 1997; 3: 467–503.
8. Di Salvo P, Bocci E, Zelli R, Polisca A. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in the bitch. *Res Vet Sci*. 2006; 81:382–388.
9. England GC, Yeager AE. Ultrasonographic appearance of the ovary and uterus of the bitch during oestrus, ovulation and early pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl*. 1993; 47:107–17.
10. England GC, Russo M, Freemán SE. Follicular dynamics, ovulation and conception rates in bitches. *Reprod Dom Anim*. 2009; 44: 53–58.
11. Forestà C, De Toni L, Di Mambro BSA, Ferlin A, Perilli L, Bertuzzi I, Galan A, Zuccarello D. Role of estrogen receptors in menstrual cycle-related neovascularogenesis and their influence on endothelial progenitor cell physiology. *Fertil Steril*. 2010; 93:220–228.
12. Forsberg CE. Biology of reproduction of the dog and modern reproductive technology. In: *The Genetics of the dog*, 2nd Ed. 2012; Eds Ostrander and A. Rubinsky, p. 295–314.
13. Freemán SE, Russo M, England GCW. Uterine artery blood flow characteristics assessed during oestrus and the early luteal phase of pregnant and non-pregnant bitches. *Vet J*. 2013; 197: 205–210.
14. Günther OJ. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. *Theriogenology*. 2014; 81:112–125.
15. Gobello C. Prepubertal and Pubertal Canine Reproductive Studies: Conflicting Aspects. *Reprod Dom Anim*. 2014; 49:e70–e73.

16. Groppetti D, Arallà M, Bronzo V, Bosi G, Piccoli A, Arrighi S. Periovulatory time in the bitch: What's new to know? Comparison between ovarian histology and clinical features. *Anim Reprod Sci.* 2015; 152:108–116.
17. Hirata M, Tanihara E, Taniguchi M, Takagi M, Terazono T, Otoi T. Follicular development of canine ovaries stimulated by a combination treatment of eCG and hCG. *Vet Med Sci.* 2018; 4:333-340.
18. Honarmand A, Aravinthakshan J, Chandola RK, Beard AP, Bartłowski PM, Pierson RA, Rawlings NC. Ultrasonographic evaluation of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers. *Anim Reprod Sci.* 2004; 80: 15–29.
19. Johnston SD, Root-Kustritz MV, Olson PNS. The feline estrous cycle. In: Johnston SD, Root-Kustritz MV and Olson PNS (eds.). *Canine and feline theriogenology*. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001, pp. 396–405.
20. Kauffold J, Rautenberg T, Richter A, Wächner M, Sobiraj A. Ultrasonographic characterization of the ovaries and the uterus in prepubertal and pubertal girls. *Theriogenology.* 2004; 61: 1635–1648.
21. König HE, Dieblich NG. Órgãos genitais femininos. Em: König HE, Dieblich NG (Eds.). *Anatomia de los animales domésticos: texto y atlas en color*. 2da ed. Buenos Aires; Madrid; Médica Panamericana, 2008, pp. 135-151.
22. Köster K, Poulsen Nastrup C, Günzel-Apel AR. A Doppler ultrasonographic study of cyclic changes of ovarian perfusion in the Beagle bitch. *Reproduction.* 2001; 122: 453–461.

23. Laffan SB, Posselt EM, Uhl JE, Vidal JD. Species comparison of postnatal development of the female reproductive system. *Birth Defects Res.* 2018; 110: 163-189.
24. Lents CA, Cushman RA, Fréking BA. Measures of the ovaries and uterus during development of girls selected for differences in uterine capacity. *J Anim Sci.* 2014; 92: 2433-2439.
25. Fontbonne A, Malandain E. Ovarian ultrasonography and follow-up of estrus in the bitch and queen. *Waham Fœtus.* 2006; 16:22-29
26. Martinat-Botté E, Royer E, Venturi E, Boisséau C, Guillaud P, Furstoss V, Terqui M. Determination by echography of uterine changes around puberty in girls and evaluation of a diagnosis of puberty. *Reprod Nutr Dev.* 2003; 43: 225-236.
27. Mättöön JS, Nyländ TG. Ultrasonography of the genital system. In: Nyländ JS, Mättöön TG (eds.). *Veterinary Diagnostic Ultrasound*. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders, 1995; pp. 141-164.
28. Morbeck DE, Esbenshade KL, Flowers WL, Britt JN. Kinetics of follicle growth in the prepubertal girl. *Biol Reprod.* 1992; 47:485-491.
29. Perry GA, Cushman RA. Invited review: Use of ultrasonography to make reproductive management decisions. *Prof Anim Sci.* 2016; 32: 154-161.
30. Polisca A, Zell R, Trost A, Orland R, Brechta G, Bött C. Power and pulsed Doppler evaluation of ovarian hemodynamic changes during diestrus in pregnant and nonpregnant bitches. *Theriogenology.* 2013; 79:219-224.
31. Schäfer-Somi S, Kayá D, Gülken N, Aslan S. Suppression of Fertility in Pre-pubertal Dogs and Cats. *Reprod Dom Anim.* 2014; 49:21-27.

32. Sing J, Adams GP, Pierson R. Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. *Anim Reprod Sci.* 2003; 78: 371-399.
33. Songsasen N, Willet DE. Size of the Donor Follicle, but not Stage of Reproductive Cycle or Seasonality, Influences Metabolic Competency of Selected Domestic Dog Oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2005; 72:113-119.
34. Songsasen N, Fickes A, Pukazhenthi BS, Willet DE. Follicular Morphology, Oocyte Diameter and Localization of Fibroblast Growth Factors in the Domestic Dog Ovary. *Reprod Domest Anim.* 2009; 44:65-70.
35. Wallace SS, Mahaffey MB, Miller DM, Thompson FN, Chakraborty PK. Ultrasonographic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the estrous cycle. *Am J Vet Res.* 1992; 53: 209-215.
36. Willet DE, Seager SWJ, Chakraborty PK. Behavioral, ovarian and endocrine relationships in the pubertal bitch. *J Anim Sci.* 1981; 53:182-191.
37. Zierésén E, Hennrichs C, Dufour D, Sæverns M, Avni EE. The role of Doppler evaluation of the uterine artery in girls around puberty. *Pediatr Radiol.* 2001; 31: 712-719.

Capítulo II

EVALUACIÓN ULTRASONOGRÁFICA BIDIMENSIONAL Y DOPPLER OVÁRICA Y UTERINADURANTE LA PUBERTAD EN HEMBRAS FELINAS

Introducción

El inicio de la pubertad en hembras felinas ocurre entre los 4 y 12 meses de edad, dependiendo de la raza, el fotoperíodo y el peso corporal (Bristol-Gould y Woodruff, 2006). Se han reportado muy pocos cambios prepúbereles en esta especie (Willet y col., 1981), motivo por el cual los propietarios suelen identificar esta condición de manera retrospectiva. Más aún, tratándose de una especie con ovulación mayormente inducida, el primer ciclo estral con frecuencia se acompaña de un servicio fértil no deseado.

En humanos, se describen distintos estados puberales en base a cambios morfológicos de los caracteres sexuales secundarios (Marshall y Tanner, 1969; 1970). Asimismo, se han caracterizado los cambios que ocurren en el tracto reproductivo de niñas antes y durante la pubertad mediante evaluación ultrasonográfica (Ivarsson y col., 1983; Battaglia y col., 2003; Baiduraki y col., 2008).

En el caso de las especies domésticas, se ha reportado que la apariencia ultrasonográfica de los ovarios facilita el diagnóstico de madurez sexual en vacas (Honarmandoz y col., 2004) y cerdas (Martinat-Botté y col., 2003; Kauffold y col.,

2004) prepuberés. En las hembras felinas, el uso de la ultrasonografía abdominal ha permitido evaluar la dinámica folicular en ciclos anovulatorios y ovulatorios mecánicamente inducidos (Málandain y col., 2011). Sin embargo, aún no se ha caracterizado la morfología de los ovarios durante la madurez sexual. Un mejor entendimiento de la fisiología reproductiva felina resultaría beneficioso para mejorar las biotecnologías de la reproducción, como así también la cría de animales domésticos y en peligro de extinción y, conjuntamente, para investigación biomédica.

La ultrasonografía bidimensional permite evaluar los cambios morfológicos de las distintas estructuras y órganos reproductivos. Sin embargo, esta técnica no permite la obtención de información funcional relacionada a los cambios en la vascularización que ocurren en distintas conexiones reproductivas (Herzog y Bollwein, 2007). Para ello es necesario realizar la evaluación con la modalidad Doppler. Tanto en caninos como en bovinos, la ultrasonografía Doppler ha demostrado ser una herramienta que permite evaluar exitosamente el tracto reproductivo de las hembras, tanto en fase folicular como luteal (Köster y col., 2001; Matsui y Miyamoto, 2009; Bergeron y col., 2013). No obstante, la evaluación ovárica mediante la modalidad Doppler aún no se ha reportado en felinos domésticos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar, mediante ultrasonografía bidimensional y Doppler, los cambios ováricos y uterinos que ocurren antes y durante la pubertad felina.

Materiales y métodos

Animales

En este estudio, se incluyeron 9 gatas mestizas, de 3 meses de edad y 1.1 ± 0.09 kg, expuestas a un fotoperíodo artificial de 14 hs luz/10 hs oscuridad. Las gatas nacieron en la colonia experimental felina, provenientes de distintas camadas y criadas sueltas en el interior de habitaciones y enriquecimiento ambiental. Las hembras fueron deslactadas a los 40 días y alimentadas con alimento seco comercial *premium* para cachorros y agua *ad libitum*. Este estudio fue aprobado por el Comité de Cuidado y Uso Animal de esta Institución y todos los protocolos experimentales se realizaron bajo las pautas establecidas en las Guías para el cuidado y uso de los animales de experimentación (IACUC N° 56-2-16F).

Seguimiento

Las gatas fueron observadas diariamente en busca de comportamiento típico de estró (ej., frotarse contra objetos, rodar, postura lordótica, lateralización de la cola y vocalización) y se realizaron evaluaciones de citología vaginal 3 veces a la semana (Mills y col., 1979; Johnston y col., 2001). La pubertad (día 1) se definió como la primera aparición de $>80\%$ de células superficiales queratinizadas en fondo limpio en la citología vaginal, durante al menos 3 muestras consecutivas obtenidas en días sucesivos, junto con la manifestación de comportamiento típico de estró. El final del estró fue determinado por la primera aparición de más del 50% de células intermedias y la ausencia de comportamiento reproductivo. Todas las

gatas fueron pesadas 1 vez a la semana utilizando balanzas electrónicas calibradas (SE-400, China).

Evaluación ultrasonográfica

Las evaluaciones ultrasonográficas en modo B y Doppler color y espectral de los ovarios se realizaron los días -50, -20, -7, 1 y 7 días después de finalizado el estrés (DE7) utilizando un transductor lineal de 14 MHz (Toshiba Nemio XG, Japón). Los días de evaluación se determinaron retrospectivamente. Los animales fueron posicionados en decúbito dorsal o sentados sobre el regazo del operador, sin el uso de sedación o anestesia. Sobre la piel rasurada, se aplicó gel para lograr un adecuado acoplamiento acústico. Los ovarios fueron identificados cerca del polo caudal del respectivo riñón. Su localización fue facilitada por la presencia del artefacto ecográfico de efecto de borde. El útero se localizó entre la vejiga y el colon (Davieson y Baker, 2009; Gatel y col, 2016). En cada evaluación se realizaron las mediciones de diámetro longitudinal y transversal de cada ovario. Se consideró como folículo antral a aquellas estructuras esféricas y anecoicas (Malandain y col, 2011; Figura 1). A su vez, en cada sección, se contabilizaron los folículos que midieron más de 1 mm de diámetro y se registró el diámetro máximo (DM, mm) del folículo de mayor tamaño hallado en cada evaluación. Se documentó el aspecto ultrasonográfico del útero, su ecogenicidad, la presencia de capas uterinas, la presencia de contenido luminal y el diámetro transversal (mm) del cuerpo uterino.

Mediante la modalidad Doppler color se examinó la vascularización intravarietal. El tamaño de la caja de color generalmente se posicionó incluyendo los límites del ovario. Se ajustaron los parámetros de filtro y ganancia en cada evaluación para obtener imágenes óptimas. Para la evaluación uterina, se utilizó ultrasonografía bidimensional en modo B para identificar el cuerpo uterino en un corte transversal. Las arterias uterinas derecha e izquierda adyacentes al cuerpo uterino se localizaron utilizando Doppler color. Con Doppler pulsado se obtuvo el trazado espectral del flujo arterial intravarietal y uterino a partir del cual se midieron la velocidad de pico sistólica (VPS; m/s) y el flujo de fin de diástole (FFD; m/s; Figura 2). El índice de resistencia (IR) se calculó automáticamente como $(VPS - FFD) / VPS$ (Blanco y col, 2008). Para minimizar la variabilidad, se registraron tres ondas uniformes y consecutivas por un único operador entrenado.

Análisis estadístico

Se corroboró la distribución normal de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk. Se compararon todos los parámetros bidimensionales y Doppler derechos e izquierdos mediante el test de Student. A su vez estos valores fueron analizados por ANOVA de medidas repetidas, seguido por Test de Tukey para determinar el efecto del tiempo sobre los parámetros (SPSS 18.0; SPSS, Chicago, IL, USA). Se consideró significativo un nivel de $p < 0,05$.

Resultados

Las hembras alcanzaron la pubertad a las $31,6 \pm 3,1$ semanas de edad, con un peso de $2,4 \pm 0,1$ (2-2,9) kg, lo cual representó un $88 \pm 3,9\%$ de su peso adulto. El primer estró dio $5,3 \pm 0,5$ (4-9) días.

En todas las imágenes ultrasonográficas bidimensionales, los ovarios se identificaron como estructuras de forma ovoideá con una ecogenidad menor a la del tejido circundante. Por su posición más craneal, el ovario derecho fue más difícil de identificar, pero fue evaluado en todas las instancias.

No se encontraron diferencias entre los parámetros bidimensionales y Doppler derechos e izquierdos ($p > 0,1$). El diámetro ovarico longitudinal se incrementó gradualmente a lo largo del estudio de 8,6 a 10,9 mm ($p < 0,01$; Figura 3), mientras que el diámetro transversal aumentó ligeramente de 4,2 a 4,6 mm ($p > 0,05$; Figura 3). En 4 gatas se detectaron múltiples estructuras esféricas anecóicas submétricas en el interior del parénquima en todas las observaciones realizadas, mientras que, en las otras 5 gatas, solo se observaron en los días -50 y -20. La estructura anecóica de menor diámetro observada fue de 0,7 mm.

El número de folículos ($p < 0,01$), el diámetro folicular promedio ($p < 0,01$) y máximo ($p < 0,05$) se incrementaron progresivamente durante el estudio (Tabla 1). Se detectaron folículos antrales por primera vez mediante ultrasonografía a las $24,5 \pm 2,4$ (18-39) semanas de edad, correspondientes a $52,5 \pm 22,4$ días previos a la aparición del primer ciclo estral.

Tabla 1. Número y tamaño de estructuras ováricas

Días de evaluación	Número de folículos	Diámetro folicular promedio (mm)	Diámetro folicular máximo (mm)
-20	$1,1 \pm 0,6^a$	$1,4 \pm 0,07^a$	$1,7 \pm 0,1^a$
-7	$2,8 \pm 0,7^{ab}$	$1,6 \pm 0,1^{ab}$	$2,4 \pm 0,2^{ab}$
1	$5,2 \pm 1,1^b$	$2 \pm 0,1^b$	$2,9 \pm 0,3^b$
DE7	$2,6 \pm 0,5^a$	$1,7 \pm 0,1^{ab}$	$2 \pm 0,1^{ab}$

Tabla 1. Variaciones en número y tamaño de estructuras ováricas (Media \pm EEM) de 9 gatas sanas en las evaluaciones del día -20 hasta su primer estró (día 1) y 7 días después del estró (DE7). Las diferentes letras indican diferencias entre los días.

El cuerpo uterino se identificó como una estructura redondeada, hipocólica con respecto a los tejidos circundantes, con un contorno hiperecóico correspondiente a la serosa. No se identificaron capas uterinas ni contenido intraluminal en las evaluaciones realizadas. Su diámetro transversal aumentó a lo largo de las evaluaciones de $3,1 \pm 0,1$ mm hasta $3,5 \pm 0,1$ mm ($p > 0,05$).

Las ondas del flujo sanguíneo intravárico y uterino del presente estudio se caracterizaron por la presencia de un pico sistólico, seguido por la onda diastólica continua con la sístole que se extiende durante el resto del ciclo cardíaco con la siguiente sístole. Esta morfología no cambió en el curso del experimento. El IR de las arterias intraváricas disminuyó durante el período estudiado ($p < 0,01$; Figura 4). El IR de las arterias uterinas también se redujo levemente hasta el primer celo de $0,58 \pm 0,02$ a $0,53 \pm 0,06$ ($p > 0,05$).

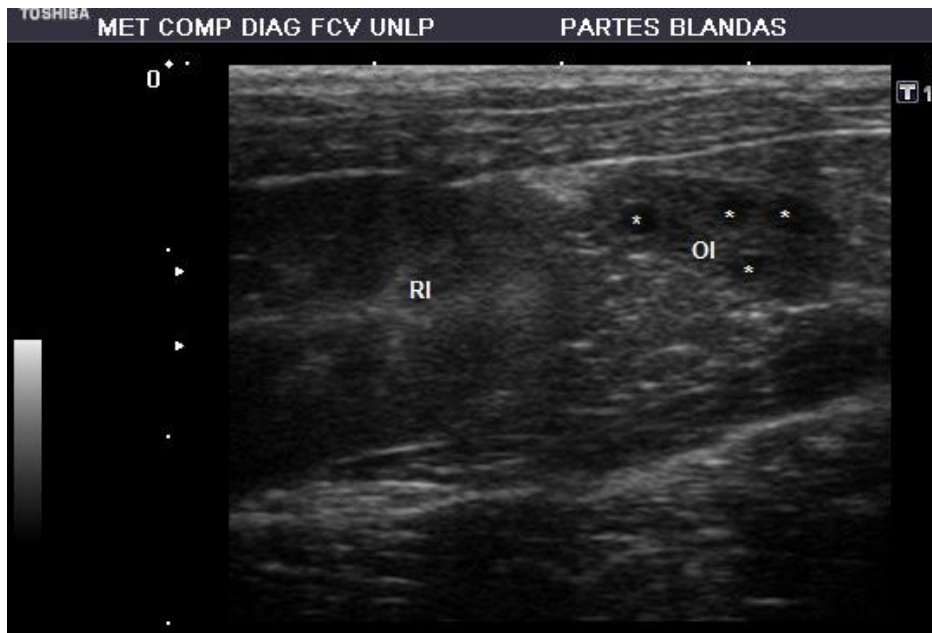


Figura 1: Imăgine longitudinală a ovarului stâng al unei femei însărcinate de 19 săptămâni de gestație (evaluare la ziua 1). Către structuri anecoice >1 mm de diametru sunt considerate foliicule (asterești).

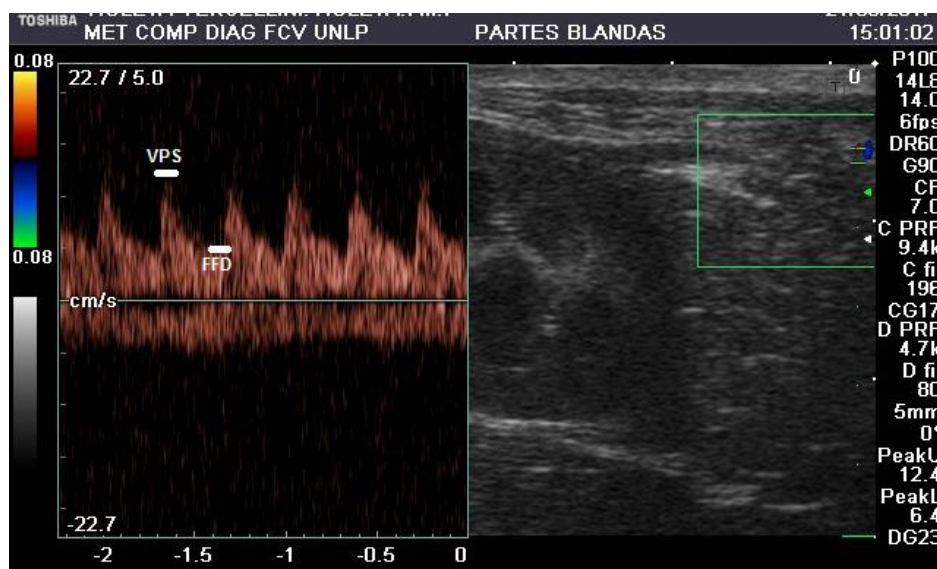


Figura 2: Doppler de arteră intraovariană al unei femei însărcinate de 31 săptămâni de gestație (evaluare la ziua -7). VPS: viteză de pic a sistolei; FFD: flux de fin de diastole.

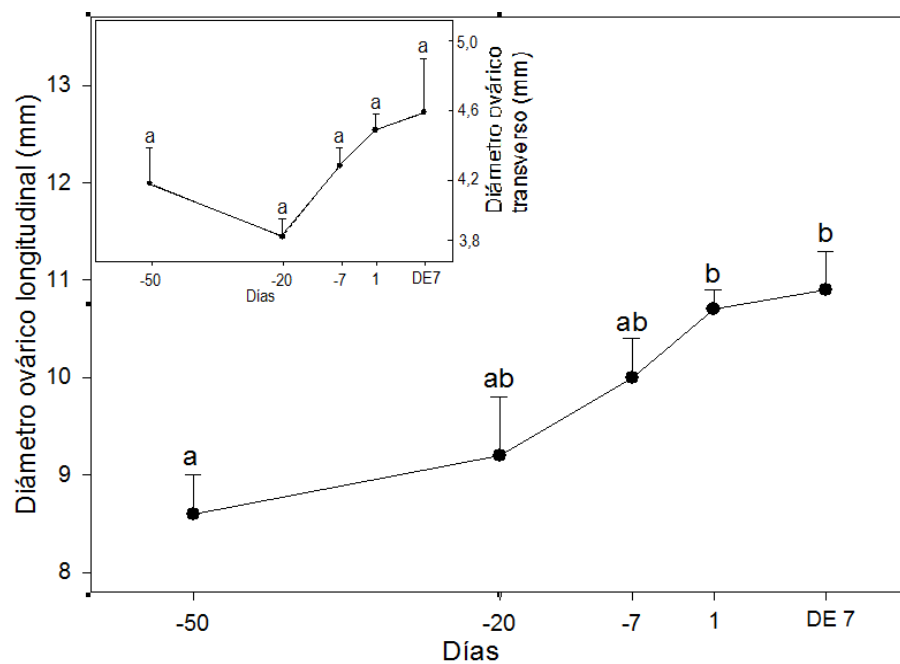


Figura 3: Diámetro ovárico longitudinal (media \pm EEM) de 9 hembras felinas evaluadas desde el día -50 hasta el primer estró (Día 1) y 7 días después del estró. **Insertado:** Diámetro ovárico transverso (media \pm EEM) de los mismos animales. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los días.

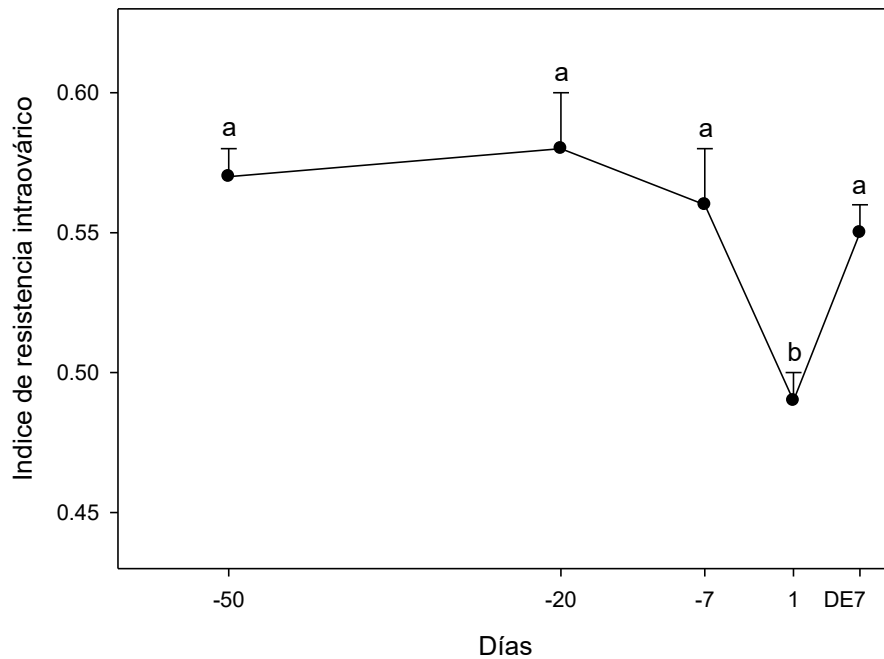


Figura 4: Índice de resistencia de las arterias intraováricas (media \pm EEM) de los mismos animales de la Figura 3, evaluadas desde el día -50 hasta el primer estró (día 1) y 7 días después del estró. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los días.

Discusión

Los resultados del presente capítulo constituyen el primer reporte sobre los cambios morfológicos y de flujo sanguíneo del ovario y útero felino antes y durante la pubertad. Durante el desarrollo puberal, el tamaño ovárico aumenta hasta las $31,6 \pm 3,1$ semanas de edad. Esto es similar a lo reportado en otros estudios felinos, en donde se reportó que el peso ovárico de gatas prepúberes de 3 meses de edad es significativamente menor al de gatas adultas (Mehl y col., 2017). Otro estudio en gatas prepúberes determinó que el peso ovárico aumentó

rápidamente hasta los 3-4 meses de edad (Uchikura y col., 2010). Los hallazgos ultrasonográficos del presente estudio complementan y amplían el seguimiento durante el crecimiento postnatal del ovario felino.

En estas gatas, el aumento del tamaño ovárico fue acompañado por un aumento en el número y tamaño de los folículos antrales. Estos cambios concuerdan con lo descrito en cerdas y vacas prepuberés, donde existe una asociación entre el número de folículos antrales y el tamaño de los ovarios (Honarmandoz y col., 2004; Lénts y col., 2014). También, en coincidencia con esto, estudios histológicos en gatas prepuberés demostraron que el aumento del peso ovárico fue acompañado por el creciente número y tamaño de los folículos antrales (Uchikura y col., 2010; Mehl y col., 2017). Histológicamente, se ha demostrado que los folículos antrales crecen gradualmente con la edad del animal, identificándose folículos de 0,1 a 0,9 mm en gatas de 100-120 días (Uchikura y col., 2010). En el presente estudio, mediante ultrasonografía se lograron identificar folículos de 0,7 mm desde las $24,5 \pm 2,4$ semanas de edad, lo que corresponde a $171,5 \pm 16,8$ días de vida. Es importante destacar dicho hallazgo ya que la ultrasonografía permite evaluar los folículos y su dinámica de una manera no invasiva, y que los ovocitos recuperados de los folículos de gatas de más de 100 días de vida demostraron capacidad para desarrollarse *in vitro* hasta el estado de blastocitos (Uchikura y col., 2010).

En la evaluación posterior al estró no se detectó la presencia de cuerpos lúteos. Sin embargo, se observaron estructuras anecóticas consideradas folículos, los cuales podrían corresponder a folículos atresicos o a aquellos que serán reclutados en el siguiente estró.

El cuerpo uterino crece progresivamente durante el estudio, en coincidencia con el crecimiento gonadal observado. Esto está en línea con lo descrito en mujeres, vacas y cerdas, donde se ha reportado un aumento de tamaño del órgano a medida que se aproxima la pubertad (Laffan y col, 2018; Honarmand y col, 2004; Kauffold y col, 2004). En gatas, la dificultad en la diferenciación de sus capas ha sido relacionada con el tamaño del órgano (Gatell y col, 2020). En mujeres, el volumen uterino ha sido correlacionado con la edad y altura (Balsuraki y col, 2008), lo que podría explicar el pequeño tamaño y escasa diferenciación parietal en las gatas prepúberes del presente estudio.

En este estudio, el aumento del tamaño ovárico y del número de folículos se asoció con una disminución del IR de las arterias intravariécas y uterinas. Este hallazgo puede indicar que el flujo sanguíneo ovárico aumenta durante el desarrollo sexual en hembras felinas. En vacas, la angiogénesis fisiológica que se produce cíclicamente en los ovarios y útero juega un papel esencial en la fisiología del sistema reproductivo (Matsui y Miyamoto, 2009). En vaquillonas, los cambios hemodinámicos están relacionados con el remodelado que ocurre en el tejido ovárico durante el crecimiento folicular y la ovulación. Estos resultados demuestran que las evaluaciones ultrasonográficas bidimensionales y Doppler de los ovarios resultan una herramienta adecuada y no invasiva para la caracterización prepúberal y púberal en hembras felinas. La identificación de eventos prepúberales tempranos en esta especie, podría aplicarse en estudios con fines contraceptivos y biotecnológicos. Esto exige la realización de más estudios ultrasonográficos sobre el desarrollo sexual y la función ovárica de la gata para alcanzar un mejor entendimiento de su fisiología reproductiva.

Sé concluyé que las dimensiónes ovarícas y uterínas, el número y tamaño de los folículos y el flujo sanguíneo intráovaríco y uteríno aumentan durante el desarrollo sexual en hembras felinas.

Bibliografía

1. Bădăuțu M, Christoforides A, Economou I, Dimitriadis AS, Kätzos G. Sonographic assessment of uterine and ovarian development in normal girls aged 1 to 12 years. *J Clin Ultrasound*. 2008; 36: 539–544.
2. Băttăglia C, Măncuș E, Reșnău G, Pănescu N, Iughețu L, De Alaysio D. Pelvic ultrasound and color Doppler findings in different sexual precocities. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2003; 22: 277–283.
3. Bergeron LH, Nykamp SG, Brissou BA, Madan P, Gartley GJ. An evaluation of B-mode and color Doppler ultrasonography for detecting periovulatory events in the bitch. *Theriogenology*. 2013; 79:274–283.
4. Blanco PG, Arias DO, Gobello C. Doppler ultrasound in canine pregnancy. *J Ultrasound Med*. 2008; 27: 1745–1750.
5. Bristol-Gould S, Woodruff TK. Folliculogenesis in the domestic cat (Felis catus). *Theriogenology*. 2006; 66: 5–13.
6. Davison AP, Baker TW. Reproductive ultrasound of the bitch and queen. *Topics in Companion Animal Medicine*. 2009; 24: 55–63.
7. Gatiel L, Gory G, Châlvét-Monfray K, Saunders JH, Raub DN. Intra and inter observer variability in ultrasonographic measurements of the uterus and

- ovaries in healthy, non-pregnant queens. *J Feline Med Surg.* 2016; 18(2): 110–117.
8. Gátel E, Rault DN, Chalvet-Monfray K, De Rooster N, Lévy X, Chiers K, Saunders JH. Ultrasonography of the normal reproductive tract of the female domestic cat. *Theriogenology.* 2020; 142: 328–337.
 9. Herzog K, Bollwein H. Application of Doppler Ultrasonography in cattle reproduction. *Reprod Dom Anim.* 2007; 42: 51–58.
 10. Honarmand A, Aravindakshan J, Chandola RK, Beard AP, Bartlewska PM, Pierson RA, Rawlings NC. Ultrasonographic evaluation of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers. *Anim Reprod Sci.* 2004; 80: 15–29.
 11. Ivansson SA, Nilsson KO, Persson PH. Ultrasonography of the pelvic organs in prepubertal and postpubertal girls. *Arch Dis Child.* 1983; 58: 352–354.
 12. Johnston SD, Root-Kustritz MV, Olson PNS, eds 2001. The feline estrous cycle. In: Canine and feline theriogenology, Saunders, Philadelphia, pp. 396–405.
 13. Kauffold J, Rautenberg T, Richter A, Wäehner M, Sobiraj A. Ultrasonographic characterization of the ovaries and the uterus in prepubertal and pubertal girls. *Theriogenology.* 2004; 61: 1635–1648.
 14. Köster K, Paulsen Nätrup C, Günzel-Apel AR. A Doppler ultrasonographic study of cycle changes of ovarian perfusion in the Beagle bitch. *Reproduction.* 2001; 122: 453–461.

15. Laffan SB, Posselt EM, Uhl JE, Vidal JD. Species comparison of postnatal development of the female reproductive system. *Birth Defects Res.* 2018; 110: 163-189.
16. Lents CA, Cushman RA, Freking BA. Measures of the ovaries and uterus during development of girls selected for differences in uterine capacity. *J Anim Sci.* 2014; 92: 2433-2439.
17. Malanandam E, Raut D, Froment E, Baudon S, Desquilbet L, Begon D, Chastant-Maillera S. Follicular growth monitoring in the female cat during estrus. *Theriogenology.* 2011; 76: 1337-1346
18. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in girls. *ArchDis Child.* 1969; 44: 291-303.
19. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *ArchDis Child.* 1970; 45: 13-23.
20. Matsui M, Miyamoto A. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: Practical use for reproductive management in the cow. *Vet J.* 2009; 181: 232-240.
21. Martinat-Botté E, Royer E, Venturi E, Boisseau C, Guillouet P, Furstoss V, Terqui M. Determination by echography of uterine changes around puberty in girls and evaluation of a diagnosis of puberty. *Reprod Nutr Dev.* 2003; 43: 225-236.
22. Mehl NS, Khalil M, Srisuwatanasagul S, Swangcham-Uthai T, Srivadyapong S. Comparison of the ovarian and uterine reproductive parameters, and the ovarian mRNA and protein expression of ENR and ESHR between the prepubertal and adult female cats. *Reprod Dom Anim.* 2017; 52: 41-44.

23. Mills JN, Valli VE, Lumsden JH. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. *Can Vet J*. 1979; 20: 95-101.
24. Uchikura K, Nagano M, Nishinuma M. Evaluation of follicular development and oocyte quality in pre-pubertal cats. *Reprod Dom Anim*. 2010; 45: e405-e411.
25. Wilt DE, Chan SYW, Seager SWJ, Chakraborty PK. Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the cortisol-induced luteal phase and the estrous period without mating. *Biol Reprod*. 1981; 25: 15-28.

Capítulo III

CAMBIOS ULTRASONOGRÁFICOS BIDIMENSIONALES Y DOPPLER DE LOS OVARIOS Y ÚTERO FELINOS EN EL PERIESTRO

Introducción

La ultrasonografía es un método de diagnóstico por imagen no invasivo que permite la visualización de los órganos internos reproductivos (Matsun y Nyland, 1995). En hembras de especies domésticas, la capacidad de esta técnica para la adquisición de datos ha permitido notables avances en materia de investigación en el área de reproducción (Günther, 2014; Allen y Wisler, 2018). En técnicas de reproducción asistida, la ultrasonografía es esencial para monitorear la actividad ovárica previa a la inseminación artificial o punción folicular (Porter 2008; Uchikura y col., 2011). Sin embargo, los cambios ultrasonográficos ováricos han sido escasamente documentados (Malandain y col., 2011; Gatiel y col., 2016; 2020). Durante el ciclo estral felino, los ovarios y el útero atraviesan cambios morfológicos bajo influencia hormonal (Johnston y col., 2001). Existen estudios que incluyen evaluaciones ecográficas tanto de los ovarios como del útero a lo largo del ciclo estral, probablemente debido al pequeño tamaño de estos órganos en las gatas (Gatiel y col., 2016). Solamente un estudio realizó un seguimiento con ultrasonografía bidimensional de los ovarios durante el estrus, pero no se realizó la evaluación uterina (Malandain y col., 2011). La identificación precisa de la

Imágen uterina bidimensional durante el ciclo estral es esencial para diferenciar los cambios fisiológicos de los patológicos.

A su vez, en los mamíferos, durante cada ciclo reproductivo ocurre una remodelación cíclica de las estructuras y vasculatura ovárica (Feng y col., 2018; Günther, 2014). El desarrollo de la ultrasonografía Doppler, permitió ampliar el alcance de las imágenes ecográficas, agregándole a la información morfológica brindada por el modo B, una base fisiológica reflejada en los cambios circulatorios.

Durante los últimos años, la ultrasonografía Doppler se ha estado aplicando cada vez más en tecnología debido a que proporciona información valiosa sobre la perfusión de los órganos reproductivos (Dickey, 1997; Nérzög y Bollwern, 2007). Esta técnica es utilizada en forma rutinaria para la examinación de ovarios y útero en vacas (Matsui y Miyamoto, 2009; Bollwern y col., 2016), yeguas (Bollwern y col., 2002; Witt y col., 2012) y cerdas (Kauffold y col., 2019), permitiendo mejoras en el manejo reproductivo. Mediante ultrasonografía Doppler, se han descrito los cambios en el índice de resistencia (IR) y en las ondas de la arteria uterina durante varios estados del ciclo estral canino (Freeman y col., 2013). En gatas, la evaluación del flujo uterino se realizó durante la preñez normal, el puerperio, el aborto y la piometra (Blanco y col., 2015; Scott y col., 2008; Blanco y col., 2014; 2016; 2018). La caracterización ultrasonográfica Doppler de los ovarios en la gata doméstica no se ha reportado aún. Se hipotetiza que durante el estro e inmediatamente luego del mismo, los ovarios y el útero se ven desarrollan modificaciones estructurales asociadas a cambios vasculares. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar mediante ultrasonografía bidimensional y

Doppler los cambios ováricos y uterinos que ocurren durante el estró y en el post estró temprano en la especie felina.

Materiales y métodos

Animales

En el estudio fueron incluidas siete hembras mestizas, de 10.3 ± 0.9 meses de edad y 2.6 ± 0.08 kg de peso. Todas las gatas tenían historia de haber transcurrido al menos dos ciclos estrales previos. Fueron alojadas en 2 habitaciones de 4 x 3 metros cada una, con enriquecimiento ambiental y expuestas a un fotoperíodo artificial de 14 hs luz 10 hs oscuridad. Fueron alimentadas con alimento seco comercial Premium y agua ad libitum.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Cuidado y Uso Animal de esta Institución (IACUC N° 56-2-167) y todos los protocolos experimentales se realizaron bajo las pautas establecidas en las Guías para el cuidado y uso de los animales de experimentación.

Seguimiento

Las gatas fueron observadas diariamente en busca de comportamientos típicos de celo (frotarse contra objetos, rodar, lamentos, lateralización de la cola y vocalización) y se realizó citología vaginal 3 veces a la semana, o cuando aparecerán signos de celo. El inicio del estró (día 1) se definió como la primera

aparición de $>80\%$ de células superficiales queratinizadas en fondo limpio en la citología vaginal, durante al menos 3 muestras consecutivas obtenidas en días sucesivos (Mills y col, 1979). Durante el éstro, la citología vaginal fue realizada diariamente. El final del éstro fue determinado por la primera aparición de más del 50% de células intermedias y la ausencia de comportamiento reproductivo (Johnston y col, 2001).

Evaluación ultrasonográfica ovárica y uterina

Las evaluaciones ultrasonográficas en modo B y Doppler color y espectral de los ovarios y útero fueron realizadas los días 1, 3 y 5 del éstro y 5 días luego del mismo (DE5), utilizando un transductor lineal de 14 MHz (Toshiba Nemio XG, Japón). Las gatas fueron posicionadas en decúbito dorsal o sentadas en posición vertical en el regazo del operador, sin el uso de sedación o anestesia. Sobre la piel rasurada, se aplicó gel para lograr un adecuado acoplamiento acústico. La evaluación se realizó luego de 5 minutos de aclimatación. Los ovarios fueron identificados cerca del polo caudal del respectivo flanco (Davieson y Baker, 2009). En cada evaluación se realizaron mediciones del diámetro longitudinal y transversal de los ovarios (mm). Se consideró como folículo antral a aquellas estructuras esféricas y anecóicas $> 1\text{mm}$. Además, se registraron el número, el promedio del diámetro externo (mm) y el diámetro máximo (mm) de esos folículos en cada gata. Se registró la presencia o ausencia de capas (visualización de las diferentes capas uterinas) y el diámetro transversal (mm) del cuerpo uterino.

Para la evaluación ovarica con modalidad Doppler, las arterias intravarias derecha e izquierda fueron localizadas dentro del tejido ovarico utilizando Doppler color. Con Doppler pulsado se obtuvo el trazado espectral del flujo de esas arterias (Koster y col, 2001). Para la evaluación uterina con modalidad Doppler, se utilizó ultrasonografía bidimensional en modo B para identificar el cuerpo uterino en un corte transversal. Las arterias uterinas derecha e izquierda adyacentes al cuerpo uterino fueron localizadas utilizando Doppler color y con Doppler pulsado se obtuvieron los trazados espectrales (Blanco y col, 2014). Para disminuir la variabilidad, se registraron 3 ondas uniformes y consecutivas por un unico operador entrenado. Se midieron la velocidad de pico sistolico (VPS; m/s) y el flujo de fin de diastole (FFD; m/s) de las arterias derecha e izquierda intravarias y uterinas; para calcular el IR automáticamente como $(VPS-FFD)/VPS$ (Blanco y col, 2008).

Análisis estadístico

Se corroboró la distribución normal de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk. Se compararon la VPS, FFD e IR de las arterias derecha e izquierda intravarias y uterinas mediante el test de Student. A su vez, estos parámetros fueron analizados por ANOVA de medidas repetidas, seguido por Test de Tukey para determinar el efecto del tiempo (SPSS 18.0; SPSS, Chicago, IL, USA). Todas las variables fueron expresadas como su promedio \pm el error estándar de la media (EEM). Se consideró significativo un nivel de $p < 0,05$.

Resultados

En estas gatas, el estró duró $4,7 \pm 0,1$ días. En el día DE5 no se detectaron ultrasonográficamente cuerpos lúteos en los ovarios de ninguno de los animales. En todas las imágenes bidimensionales, los ovarios se observan ovales e hipocóicos comparados con los tejidos adyacentes (Figura 1). A pesar de que fue más difícil identificar el ovario derecho que el izquierdo, su evaluación fue realizada en todos los casos. No se encontraron diferencias entre los parámetros bidimensionales y Doppler derechos e izquierdos ($p > 0,1$), por lo que se promediaron dichos valores. En estas gatas, los diámetros longitudinales y transversos ováricos no cambiaron durante el período estudiado ($p > 0,1$; Tabla 1). Múltiples estructuras esféricas anecóicas y submúltiples se detectaron de forma variable durante el transcurso del experimento. El número total de folículos disminuyó en el día DE5 ($p < 0,05$; Tabla 1). El diámetro folicular promedio y máximo aumentaron gradualmente durante el estró y luego disminuyeron en el día DE5 ($p < 0,05$; Tabla 1).

Tabla 1: Mediciones ultrasonográficas de los ovarios (media \pm EEM) durante y luego del estró de 7 hembras felinas sanas.

Días de evaluación	Diámetro longitudinal ovárico (mm)	Diámetro transverso ovárico (mm)	Número de folículos	Tamaño folicular promedio (mm)	Máximo diámetro folicular (mm)
1	11,5 \pm 0,5 ^a	5,1 \pm 0,3 ^a	5,4 \pm 0,5 ^a	2,1 \pm 0,1 ^a	2,8 \pm 0,2 ^a
3	10,4 \pm 0,5 ^a	5,2 \pm 0,3 ^a	5,7 \pm 0,6 ^a	2,5 \pm 0,1 ^{ab}	3,2 \pm 0,3 ^b
5	11,5 \pm 0,4 ^a	5 \pm 0,2 ^a	5,6 \pm 0,3 ^a	2,6 \pm 0,1 ^b	4,1 \pm 0,1 ^b
DE5	11,6 \pm 0,6 ^a	5 \pm 0,2 ^a	3,5 \pm 0,6 ^b	1,9 \pm 0,1 ^a	2,6 \pm 0,2 ^a

Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los días.

En 5 de las 7 gatas (71,4%) tanto en estró como luego del mismo, el útero se observó hipocóico comparado con el tejido circundante y delineado por una delgada línea hiperecótica. Las capas uterinas se distinguieron en 2 de las 7 gatas (28,6%) durante el estró y luego del mismo. En estos casos, se observaron 2 capas: el endometrio hipocóico con respecto al miometrio que se observó ecogénico. El diámetro transverso del cuerpo uterino se mantuvo sin cambios significativos a lo largo de las evaluaciones ($p > 0,1$).

La forma de las ondas del flujo arterial de los ovarios presentó un pico sistólico y flujo diastólico que se extendía a lo largo del resto del ciclo cardíaco hasta la siguiente sístole (Figura 2). La morfología de dichas ondas no se modificó durante el transcurso del experimento. El FFD aumentó en el día 5 y disminuyó luego del estró ($p < 0,05$), mientras que la VPS se mantuvo sin cambios ($p > 0,1$). El IR de las arterias intravariaricas disminuyó hacia el día 5 y luego aumentó el día DE5 ($p < 0,05$; Figura 3).

La forma de las arterias uterinas también se caracterizó por un pico sistólico y flujo diastólico extendiéndose a través del ciclo cardíaco hasta la siguiente sístole (Figura 4). Este patrón fue detectado en todas las gatas y en todas las evaluaciones. Sin embargo, durante la mayoría de las evaluaciones realizadas en éstro, la muesca diastólica temprana fue pequeña o ausente. El EED disminuyó luego del éstro ($p < 0,05$), mientras que la VPS no cambió ($p > 0,1$). El índice de resistencia de las arterias uterinas fue menor durante el éstro que en el post éstro ($0,53 \pm 0,01$ vs. $0,59 \pm 0,00$, respectivamente; $p < 0,05$).

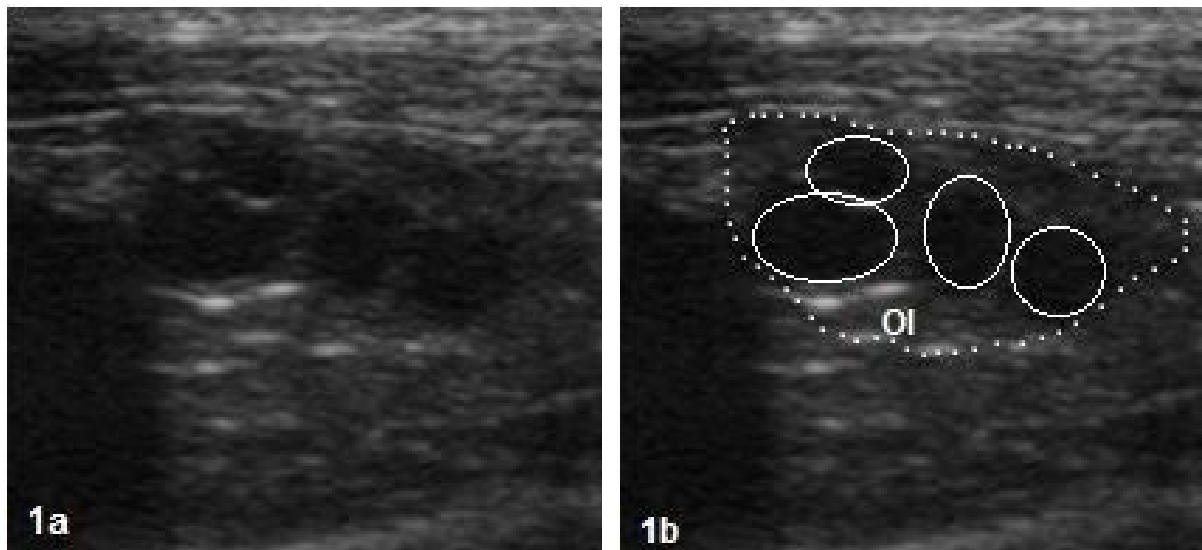


Figura 1: Imágenes longitudinales del ovario izquierdo de una hembra felina en el día 3 del éstro. En 1b, el ovario está delineado con una línea punteada blanca y se observan 4 estructuras anecóicas >1 mm (folículos) rodeadas por una línea sólida blanca.



Figura 2: Doppler pulsado de las arterias intraováricas de una hembra felina durante el celo. VPS: Velocidad de pico sistólica; FFD: flujo de fin de diástole.

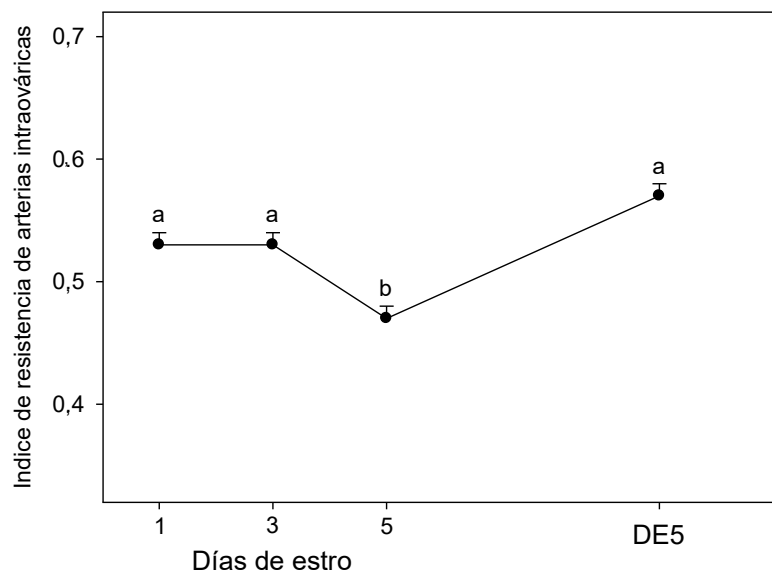


Figura 3: Índice de resistencia de las arterias intraováricas (media \pm SEM) de 7 hembras felinas evaluadas los días 1, 3 y 5 del estró y 5 días posteriores al mismo (DE5). Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los días.

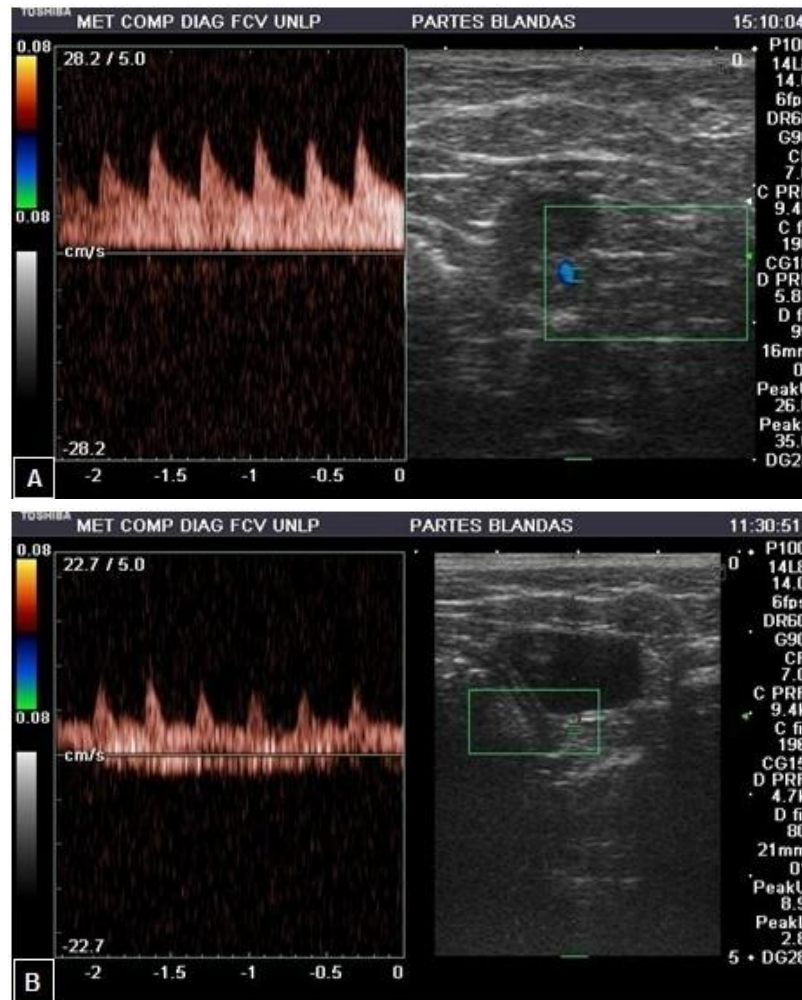


Figura 4: Imagen ultrasonográfica con modalidad Doppler pulsado de las arterias uterinas de una hembra felina durante el estró (A) y 5 días posterior al mismo (DE5; B).

Discusión

Hasta donde sabemos, los resultados del presente capítulo proporcionan el primer reporte ultrasonográfico sobre los cambios estructurales y de flujo sanguíneo de los ovarios y útero felino durante y después del estró de ciclos anovulatorios de gatas pospúberes. Los tamaños de los ovarios y del cuerpo uterino observados en

este estudio fueron similares a lo reportado previamente en estudios ultrasonográficos en hembras felinas adultas (Gaté y col., 2020). A pesar de las diferencias estructurales encontradas a lo largo del ciclo, como el crecimiento folicular o la demarcación de las paredes uterinas, no se encontraron cambios en las dimensiones de los órganos. Cabe destacar que el diámetro ovárico máximo se registró en la evaluación del día 5, probablemente debido al mayor diámetro folicular máximo detectado ese día. En caninos, se describieron variaciones en el tamaño ovárico mediante ultrasonografía durante la fase folicular y lutea del ciclo estral (Wallace y col., 1992). La diferencia con las gatas de este estudio podría deberse al menor tamaño de los órganos en esta especie, que dificulta la medición de variaciones sutiles en tamaño.

En estas gatas, el número de folículos antrales detectados al inicio del estró fue similar a los reportados previamente en gatas domésticas para el mismo estado del ciclo estral (Malandain y col., 2014). El número de folículos aumentó ligeramente durante el estró y luego disminuyó, evidenciando el reclutamiento inicial de una cohorte de folículos, algunos de los cuales sufrirán atresia (Wilk y col., 1984; Evans, 2003). En concordancia con reportes previos, en estas gatas el estró se caracterizó por una cohorte de 3 a 7 folículos dominantes (Johnston y col., 2001).

El tamaño folicular también aumentó durante el estró, alcanzando el mayor diámetro el Día 5 de la evaluación. Estos resultados están de acuerdo con reportes ultrasonográficos previos sobre ovarios felinos, donde el diámetro folicular aumentó bruscamente durante los primeros 4 días de estró, para alcanzar una meseta por 1 o 2 días y luego disminuir (Malandain y col., 2014). El tamaño folicular medido

en estas gatas coincide con reportes previos ultrasonográficos e histológicos en gatas domésticas (Reynaud y col., 2009; Malanadán y col., 2011; Amélinká y col., 2015; Gátel y col., 2020). En este estudio, el tamaño folicular máximo detectado fue ligeramente mayor al reportado previamente mediante ultrasonografía (4,3 mm vs 4,1 mm; Malanadán y col., 2011). Esto quizás se explique debido a los diferentes observadores, equipos y transductores utilizados. Es importante mencionar que, en otros ensayos felinos, los oocitos recolectados de los folículos más grandes, mostraron mayor capacidad de maduración *in vitro* en gatas sexualmente maduras (Uchikura y col., 2010).

Curiosamente, numerosas estructuras anecóicas, submilimétricas, fueron observadas en los ovarios a lo largo del estudio. Estas estructuras pueden corresponder a folículos antrales tempranos, que han sido descritos en evaluaciones histológicas del ovario felino a lo largo del ciclo estral (Uchikura y col., 2010; Méhl y col., 2017). En todas las gatas evaluadas, se detectaron ultrasonográficamente folículos antrales >1 mm en el día DE5. Considerando la corta duración de los ciclos anovulatorios en la gata, existe la posibilidad de que estos constituyan los folículos que serán reclutados en el estró subsiguiente.

Aunque se ha descrito la apariencia ultrasonográfica del útero en la gata doméstica (Gátel y col., 2016; 2020), no se han reportado diferencias entre las imágenes obtenidas en el estró y el interestró. Particularmente, en el presente estudio, la estratificación de la pared uterina fue observada durante y después del estró, probablemente debido a la influencia de los estrógenos (Johnston y col., 2001). La distinción entre las capas uterinas en esta especie resulta sumamente difícil debido al tamaño pequeño del órgano.

La morfología de las ondas de las arterias intraováricas fue constante durante todo el experimento y siempre mostró un patrón de baja resistencia, lo que puede explicarse por la proximidad de estos vasos con el área capilar del tejido ovárico (Díckey, 1997). Se detectó un aumento del FFD en el día 5, probablemente debido a la reducción de la resistencia en los vasos arteriales ováricos. En este estudio, el aumento en el número y tamaño folicular se asocia con la disminución en el IR de las arterias intraováricas, probablemente causadas por el aumento en el FFD antes mencionado, con VPS constante. El componente diastólico del ciclo cardíaco parece ser más preciso para reflejar los cambios en el IR que la porción sistólica (Díckey, 1997; Chossén y col., 2008). Este hallazgo indica que la resistencia al flujo sanguíneo ovárico disminuye en la fase folicular. Se encontraron resultados similares en perras, donde la perfusión intraovárica aumentó gradualmente desde el proestro hasta el periodo proovulatorio (Koster y col., 2004). De acuerdo con reportes previos sobre la arquitectura tridimensional de los vasos ováricos en modelos murinos, el desarrollo folicular es acompañado por un aumento en la ramificación de la vasculatura (Feng y col., 2018). En las vacas, el flujo sanguíneo de los folículos antrales también ha demostrado estar estrechamente relacionado con el crecimiento folicular (Matsu y Miyamoto, 2009; Nichols y col., 2019).

En todas las gatas y en las instancias de evaluación, la morfología de las ondas de las arterias uterinas, se caracterizaron por un componente diastólico continuo. Este patrón corresponde a las formas de onda tipo C definida por Díckey (1997), que es indicativa de baja resistencia vascular (Díckey, 1997). Este tipo de morfología de onda se observó durante la mayoría de las etapas del ciclo estral canino,

exhibiendo una miéscá elástica temprana (Fréemán y col., 2013). A diferencia de las perras, la morfología de ondas de las arterias uterinas de estas gatas, se caracterizaron principalmente por una miéscá elástica temprana leve o ausente durante la mayoría de las evaluaciones estrales. Este resultado es consistente con un reporte previo en gatas gestantes, donde la ausencia de la miéscá también se detectó en las arterias uterinas con resistencia disminuida (Blanco y col., 2014).

Estas gatas presentaron una menor resistencia de las arterias uterinas durante el estró que en el postestro. A la inversa de lo observado en la fase folicular, se detectó una miéscá elástica temprana en la mayoría de las formas de onda de las arterias uterinas en DE5, lo que indica un aumento en la resistencia en estos vasos. Este hallazgo es consistente con estudios en vacas, yeguas y cerdas y puede deberse a la influencia de los estrógenos, entre otras moléculas, sobre el músculo liso de los vasos uterinos (Nérezog y Bollwén, 2007; Nönnens y col., 2011; Hérit y col., 2018). Este efecto estrógeno también se postula en perras, donde se observó un aumento en el IR uterina tres días antes de la ovulación, en el momento en que disminuyen las concentraciones de estrógenos y aumentan las de la progesterona (Fréemán y col., 2013).

Se concluye que, en las gatas domésticas, el número y el diámetro folicular, como así también los flujos sanguíneos ovárico y uterino se modificaron durante e inmediatamente después del estró en ciclos anovulatorios. Las modalidades ultrasonográficas bidimensional y Doppler resultaron adecuadas para evaluar los cambios morfológicos y hemodinámicos involucrados en la remodelación cíclica de los tejidos ovárico y uterino que se produce durante y después del crecimiento folicular en gatas domésticas.

Bibliografía

1. Allen WR, Wilsher S. Half a century of equine reproduction research and application: A veterinary tour de force. *Equine Vet J.* 2018; 50: 10-21.
2. Porter MB. Ultrasonid in assisted reproductive technology. *Semin Reprod Med.* 2008; 26: 266-276.
3. Amelkáná O, Braun BC, Dehnbard M, Jewgenow K. The corpus luteum of the domestic cat: Histologic classification and intraluteal hormone profile. *Theriogenology.* 2015; 83: 711-720.
4. Blanco PG, Arias DO, Góbellis C. Doppler ultrasonid in canine pregnancy. *J Ultrasonid Med.* 2008; 27: 1745-1750.
5. Blanco PG, Rodríguez R, Olguin S, Rubé A, Tortora M, Góbellis C. Doppler ultrasonográfico assessment of maternal and fetal arteries during normal feline gestation. *Anim Reprod Sci.* 2014; 146: 63-69.
6. Blanco PG, Rodríguez R, Bástia PR, Barréná JP, Arias DO, Góbellis C. Bidimensional and Doppler ultrasonográfico evaluation of postpartum uterine involution in the queen. *Theriogenology.* 2015; 84: 82-85.
7. Blanco PG, Vercellini R, Rubé A, Rodríguez R, Arias DO, Góbellis C. Evaluation of feline uterine and umbilical arteries blood flow in a pharmacologically induced abnormal gestation model. *Theriogenology.* 2016; 86: 2322-2327.
8. Blanco PG, Rubé A, López Merlo M, Bástia PR, Arias DO, López Knudsen I, Tortora M, Góbellis C. Uterine two-dimensional and Doppler

- ultrasonographic evaluation of female pyometra. *Reprod Domest Anim.* 2018; 53: 70–73.
9. Bollwein H, Heppelmann M, Lüttgenau J. Ultrasonographic Doppler use for female reproduction management. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2016; 32: 149–164.
 10. Bollwein H, Weber E, Kolberg B, Stollä R. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology.* 2002; 57: 2129–2138.
 11. Davidson AP, Baker TW. Reproductive ultrasound of the bitch and queen. *Top Companion Anim Med.* 2009; 24: 55–63.
 12. Chossien JS, Morris RK, ter Riet G, Mol BWJ, van der Post JAM, Coomarasamy A Zwinderman AH, Robson SC, Bindels PJE, Kleijnen J, Khan KS. Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis. *CMAJ.* 2008; 178:701–711.
 13. Dickey RP. Doppler ultrasound investigation of uterine and ovarian blood flow in fertility and early pregnancy. *Hum Reprod Update.* 1997; 3: 467–503.
 14. Evans ACC. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod Domest Anim.* 2003; 38: 240–246.
 15. Feng Y, Tamaddon A, Hsueh AJW. Imaging the ovary. *Reprod Biomed Online.* 2018; 36: 584–593.
 16. Freeman SL, Russo M, England GCW. Uterine artery blood flow characteristics assessed during oestrus and the early luteal phase of pregnant and non-pregnant bitches. *Vet J.* 2013; 197: 205–210.

17. Gátel E, Gory G, Châlvét-Monfray K, Saunders JH, Rauck DN. Intra- and inter-observer variability in ultrasonographic measurements of the uterus and ovaries in healthy, non-pregnant queens. *J Feline Med Surg.* 2016; 18:110–117.
18. Gátel E, Rauck DN, Châlvét-Monfray K, De Rooster H, Lévy X, Chiers K, Saunders JH. Ultrasonography of the normal reproductive tract of the female domestic cat. *Theriogenology.* 2020; 142: 328–337.
19. Günther OJ. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. *Theriogenology.* 2014; 81: 112–125.
20. Herk C, Stärk R, Sigmundsson HE, Käuffold J. Feasibility of transabdominal Doppler sonography for studying uterine blood flow characteristics in cycling goats. *Tierärztl-Prakt Ausg G Grosstiere Nutztiere.* 2018; 46: 154–163.
21. Herzog K, Bollwein H. Application of Doppler ultrasonography in cattle reproduction. *Reprod Domest Anim.* 2007; 42: 51–58.
22. Hännens A, Weisser S, Wehr H, Einspänner R, Bollwein H. Relationships between uterine blood flow, peripheral sex steroids, expression of endometrial estrogen receptor and nitric oxide synthases during the estrous cycle in mares. *J Reprod Dev.* 2011; 57: 43–48.
23. Johnston SD, Root-Kustritz MV, Olson PNS. The feline estrous cycle. In: Johnston SD, Root-Kustritz MV and Olson PNS (eds.). *Canine and feline theriogenology*. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001, pp. 396–405.
24. Käuffold J, Peltoniemi O, Wehrnd A, Althouse GC. Principles and clinical uses of real-time ultrasonography in female swine reproduction. *Animals.* 2019; 9: 950.

25. Köster K, Poulsen Nautrup C, Günzel-Apel AR. A Doppler ultrasonographic study of cyclic changes of ovarian perfusion in the Beagle bitch. *Reproduction*. 2001; 122: 453–461.
26. Malandain E, Raouf D, Froment E, Baudouin S, Desquilbret L, Bégon D, Chastant-Mailllard S. Follicular growth monitoring in the female cat during estrus. *Theriogenology*. 2011; 76: 1337–1346.
27. Matsui M, Miyamoto A. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: Practical use for reproductive management in the cow. *Vet J*. 2009; 181: 232–240.
28. Mattoon JS, Nyländ TG. Ultrasonography of the genital system. En: Nyländ JS, Mattoon TG (eds.). *Veterinary Diagnostic Ultrasound*. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders, 1995, pp. 141–164.
29. Mehl NS, Khalifa M, Srisuwatanasagul S, Swangchan-Uthai T, Sivavadyapong S. Comparison of the ovarian and uterine reproductive parameters, and the ovarian mRNA and protein expression of LHR and FSHR between the prepubertal and adult female cats. *Reprod Domest Anim*. 2017; 52: 41–44.
30. Mills JN, Valli VE, Lumsden JH. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. *Can Vet J*. 1979; 20: 95–101.
31. Nichols JA, Pérégo MC, Schütz LE, Hémaple AM, Spicer LJ. Hormonal regulation of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) gene expression in granulosa and theca cells of cattle. *J Anim Sci*. 2019; 97: 3034–3045.
32. Reynaud K, Gréquel C, Thumire S, Chebraut M, Fichoux C, Bستانجي M, Chastant-Mailllard S. Folliculogenesis and morphometry of oocyte and follicle growth in the feline ovary. *Reprod Domest Anim*. 2009; 44: 174–179.

33. Scott L, Di Salvo P, Bocca E, Pieramati C, Polisca A. Doppler evaluation of maternal and foetal vessels during normal gestation in queen. *Theriogenology*. 2008; 69: 1111–1119.
34. Uchikura K, Nagano M, Nishinuma M. Evaluation of follicular development and oocyte quality in pre-pubertal cats. *Reprod Domest Anim*. 2010; 45: e405–e411.
35. Uchikura K, Nagano M, Nishinuma M. The Effect of Ovarian Status and Follicular Diameter on Maturation Ability of Domestic Cat Oocytes. *Theriogenology*. 2011; 73: 561–566.
36. Wallace SS, Mahaffey MB, Miller DM, Thompson EN, Chakraborty PK. Ultrasonographic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the estrous cycle. *Am J Vet Res*. 1992; 53: 209–215.
37. Wilat DE, Chan SYW, Seager SWJ, Chakraborty PK. Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. *Biol Reprod*. 1981; 25: 15–18.
38. Witt MC, Bollwein H, Probst J, Baackmann C, Squires EL, Semel H. Doppler sonography of the uterine and ovarian arteries during a superovulatory program in horses. *Theriogenology*. 2012; 77: 1406–14.

Capítulo IV

CRONOLOGÍA DEL CIERRE DE LOS CARTÍLAGOS DE CRECIMIENTO EN CANINOS DE TALLA PEQUEÑA Y SU RELACIÓN CON LA PUBERTAD

Introducción

Como se mencionará en capítulos previos, el crecimiento de un animal está determinado por múltiples factores, como genéticos, ambientales, hormonales, entre otros (Mackie y col., 2011). En los mamíferos, el crecimiento y la pubertad son dos procesos mutuamente relacionados (Bourguignon, 1991; Weise y col., 2001; Kullorn y col., 2002). Se ha postulado que es necesario alcanzar un peso corporal crítico para que la pubertad ocurra (Baker, 1985). A su vez, las hormonas sexuales como el estradiol juegan un rol importante en el cierre físico, fenómeno que determina la longitud final de los huesos largos (Nelson y col., 2005). La especie canina tiene la particularidad de que su altura y peso corporal son muy variables entre las distintas razas. La altura al hombro y peso corporal en perros adultos oscila entre 13 cm y 1 kg en razas minúsculas hasta 79 cm y más de 90 kg en razas gigantes, respectivamente (Nap y Házewinkel, 1994). A su vez, estas razas tienen diferente patrón de crecimiento: las razas pequeñas alcanzan el peso adulto entre los 8 y 12 meses de edad, mientras que las razas grandes requieren más de 24 meses para alcanzarlo (Salt y col., 2017; Teunissen y col., 2018). En humanos, el desarrollo esquelético de niños y adolescentes se evalúa a partir de la

aparición de la fisis y los huesos de la mano y carpo (Gilsanz y Rubin, 2005), que guarda relación con los estándares puberales descritos por Tanner (Marshall y Tanner, 1969; 1970).

La radiología es el método de diagnóstico por imágenes de primera elección para la evaluación ósea. En un animal en desarrollo, esta técnica permite observar variaciones en la forma y tamaño de los huesos, así como la desaparición de los cartílagos de crecimiento y su posterior osificación (Kondé, 1998). A pesar de las diferencias entre las razas previamente mencionadas, la mayoría de los estudios sobre desarrollo óseo (Castillo y col, 1997; Riser y Shirer, 1965; Nap y col, 1991) y la cronología en el cierre de los cartílagos fisarios se reportaron en Beagles y en razas grandes y gigantes (Yonamine y col, 1980; Sumner-Smith, 1966). A su vez, sólo se han reportado dos estudios sobre la secuencia de los cierres fisarios y su relación con la pubertad (Marlot y col, 1985; Kilborn y col, 2002). Considerando que la aparición radiológica de los cartílagos fisarios es similar a la de ciertas lesiones óseas, resulta indispensable conocer en detalle el momento de ocurrencia del cierre fisario de los perros de talla pequeña a fin de evitar errores diagnósticos. Adicionalmente, así como el crecimiento de los cachorros de razas pequeñas finaliza antes que el de las demás razas, es dable esperar que el cierre fisario completo tenga lugar también a edades más tempranas en esa población canina. Finalmente, es necesario conocer la influencia de la pubertad sobre el cierre en tanto determinadas opciones terapéuticas contraceptivas podrían afectar el desarrollo esquelético normal de un canino en crecimiento.

Por lo tanto, el objetivo del estudio fue (1) determinar la edad de cierre de los cartilagos de crecimiento en caninos de talla pequeña y (2) relacionar el cierre físico con la pubertad en esta población canina.

Materiales y métodos

Animales

En este estudio se incluyeron 12 perros sanos de tamaño pequeño (<10 kg de peso adulto), machos y hembras, de raza pura y mestizos, de 3 meses de edad. Los perros vivían con sus propietarios, pertenecían a diferentes camadas, fueron deslactados a los 40-45 días de edad y alimentados con alimento seco comercial *premium* y agua *ad libitum*. Se les realizó un examen clínico general junto con hemograma y bioquímica completa al inicio del estudio. Este estudio fue aprobado por el Comité de Cuidados y Uso Animal de esta Institución y todos los protocolos experimentales se realizaron bajo las pautas establecidas en las Guías para el cuidado y uso de los animales de experimentación (IACUC N° 56-2-16T).

Seguimiento

Los perros fueron evaluados clínicamente y radiológicamente una vez al mes. En cada evaluación fueron pesados y medidos (altura a la cruz). Las perras fueron evaluadas por los tutores entrenados para identificar descarga vulvar sanguinolenta como signo de proestro y/o comportamiento típico de celo. Luego

del proestro fueron examinadas directamente mediante citología vaginal. En machos, se realizó la extracción manual de semen para su evaluación microscópica de forma mensual. El inicio de la pubertad fue definido por la primera aparición de 90% de células superficiales del epitelio vaginal y comportamiento típico y por la aparición de espermatozoides en el semen, en hembras y machos, respectivamente (Johnston y col., 2001).

Se realizaron radiografías digitales (GBA-Moblex 150 HF, Argentina y digitalizador FujiFilm ECR-PRIMA II/consola ECR-PRIMA, Japón) con el animal sobre la camilla, sin el uso de sedación o anestesia. En cada animal, se realizaron incidencias medio lateral y craneo caudal de los miembros anteriores y posteriores para evaluar las características de los cartilagos de crecimiento proximal y distal del humero, radio, cubito, ulna y perone, distal de femur, metacarpiños y metatarsiños, proximal de falanges y núcleos de crecimiento de la tuberosidad de la ulna, tuberosidad escapular, hueso accesorio y calcáneo. Con el desarrollo del animal, el cartilago de crecimiento es reemplazado por tejido óseo (cierre fisario) lo cual se detecta radiográficamente por la desaparición de la línea radiolúcida que caracteriza a dichos cartilagos (Von Pfeil y De Camp, 2009). De acuerdo con los signos radiológicos de cierre fisario, las fisas del esqueleto apendicular fueron clasificadas como abiertas o cerradas (Figura 1). Se midió la longitud humeral, radial, femoral y ulnar en las proyecciones radiográficas medio-laterales (Root Kustritz y col., 1997; Yonamine y col., 1981).

Análisis estadístico

La edad, peso, altura y longitud radial de los animales se expresaron en promedio \pm el error estándar de la media (EEM). El peso, la altura y la longitud radial se analizaron con un ANOVA de medidas repetidas, seguido por un test de Tukey para determinar el efecto del tiempo sobre dichos parámetros. Se realizó una regresión logística binaria para predecir la ocurrencia en el cierre de las placas de crecimiento utilizando la edad y la pubertad como predictores (SPSS 18.0; SPSS, Chicago, IL, USA). Se consideró significativo un nivel de $p < 0,05$.

Resultados

En los animales evaluados, el peso y la altura aumentaron a lo largo del estudio hasta los 7 meses de edad ($p < 0,05$; Figuras 2 y 3). A su vez, la longitud radial, humeral y ulnar se incrementó hasta los 6 meses de edad ($p < 0,05$), mientras que la longitud femoral aumentó significativamente hasta los 7 meses de edad ($p < 0,05$; Figura 4). Los perros alcanzaron la pubertad a los $9,5 \pm 0,7$ (7-13) meses de edad, pesando $6,8 \pm 0,6$ (3,9-10,2) kg, y $29,7 \pm 2,2$ (22-38,5) cm de altura lo cual representó un 95 ± 1 % de su peso y 98 ± 1 % de su altura adulta.

En estos perros, el cierre fisario se completó a lo largo de los primeros 11 meses de vida, con un efecto significativo del tiempo sobre esos cerrés ($p < 0,01$; Tabla 1). La pubertad influyó el cerré de la fisis proximal del humero (Odds ratio=31,5; $p < 0,01$) y la fisis distal del radio (Odds ratio=62,6; $p < 0,01$). Sin embargo, no se detectaron efectos de la pubertad en el resto de las fisis ($p > 0,1$).



Figura 1. Radiografías en proyección medio-lateral del antebrazo de un niño evaluados a los 3 (A) y 9 meses (B) de edad. En los extremos de los huesos largos se encuentran los cartilagos de crecimiento radiolucidos (3 meses; A) sin osificar. Con flechas amarillas se indica la fisis proximal y distal del radio.

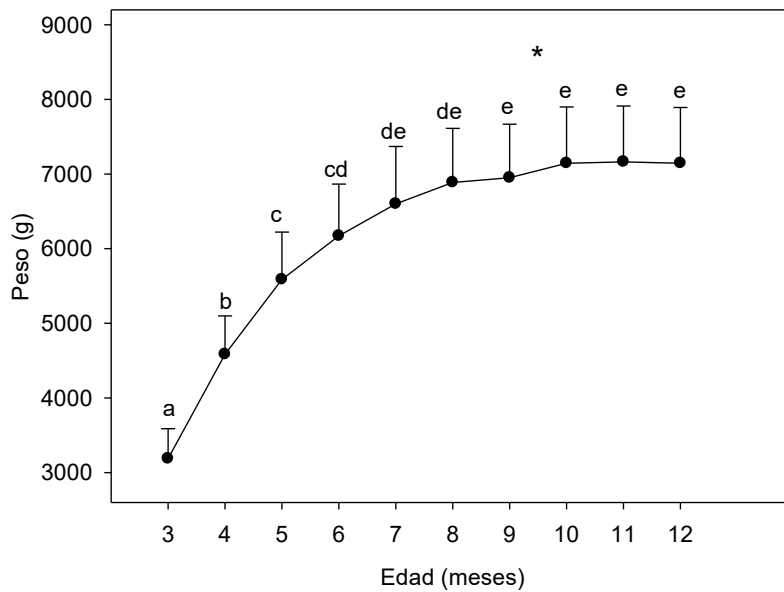


Figura 2. Variaciones en el peso de 12 perros de talla pequeña (promedio \pm EEM) a lo largo del periodo evaluado. Asterisco: señala el momento de ocurrencia de la pubertad. Las diferentes letras indican diferencias entre los días ($p < 0,01$).

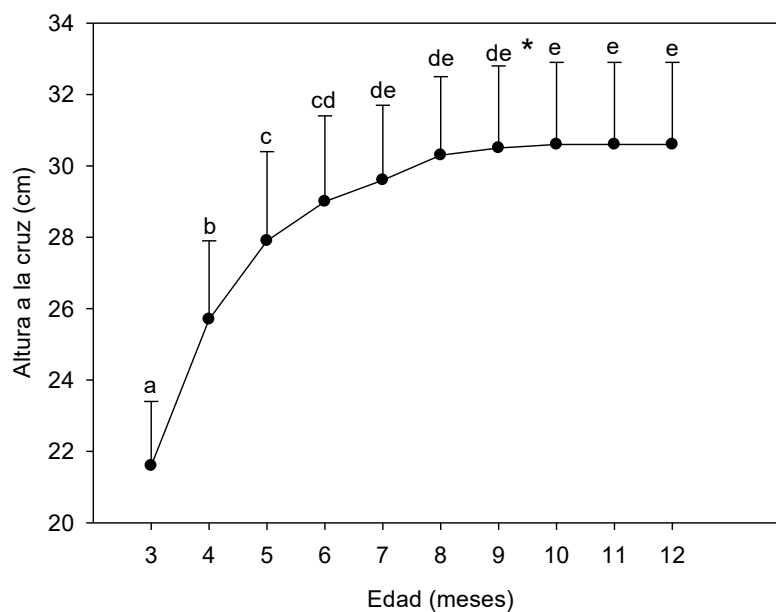


Figura 3. Variaciones en la altura de los mismos perros de la Fig. 2 (promedio \pm EEM) a lo largo del periodo evaluado. Asterisco: señala el momento de

ocurrencia de la pubertad. Las diferentes letras indican diferencias entre los días

($p < 0,01$).

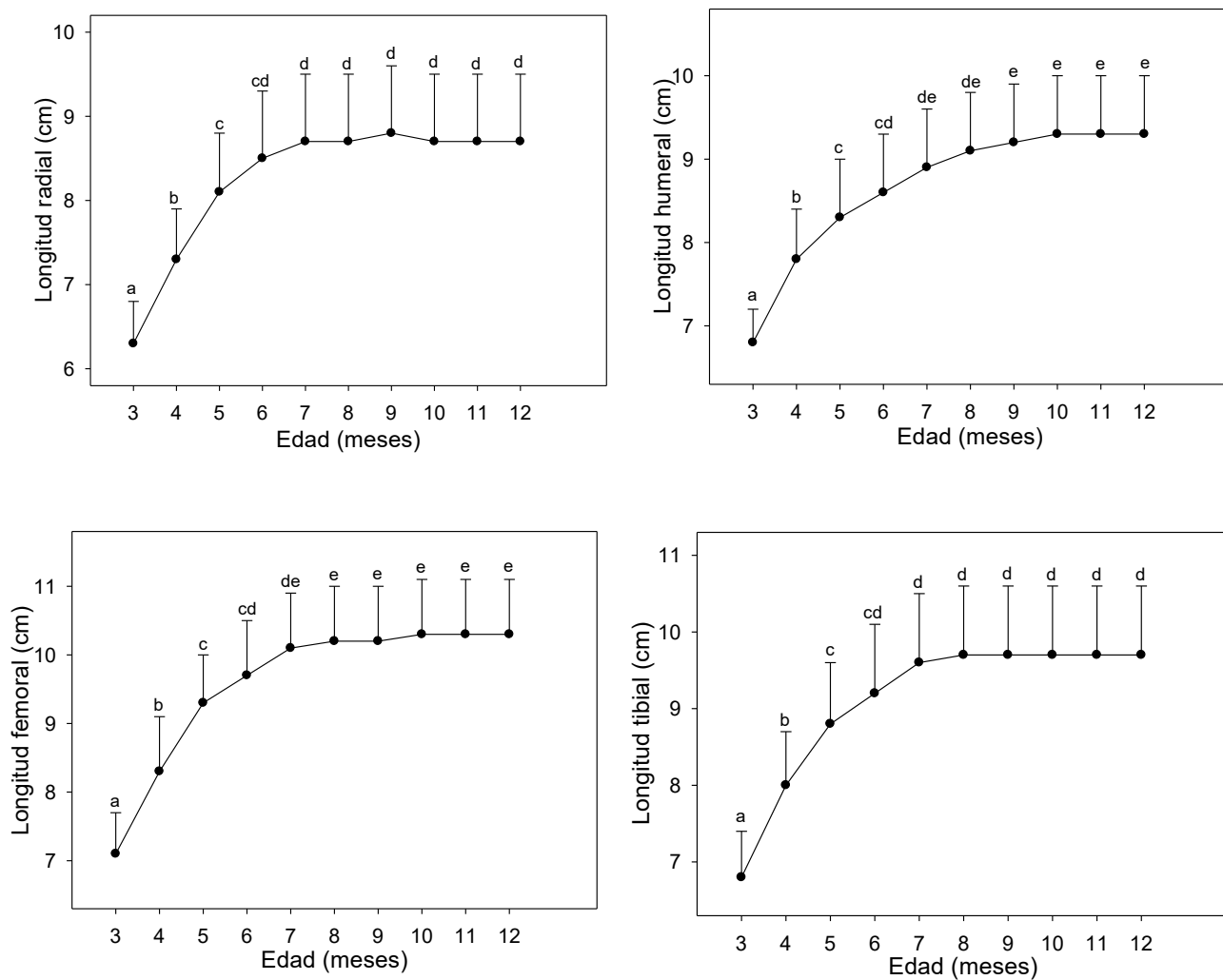


Figura 4. Variaciones en la longitud radial, humeral, femoral y tibial de los 12 perros (promedio \pm EEM) a lo largo del periodo evaluado. Las diferentes letras indican diferencias entre los días ($p < 0,01$).

Tabla 1. Cierre fisario en meses (promedio \pm EEM) de 12 perros sanos de talla pequeña.

Hueso	Edad (meses)
Escápula tuberosidad supraglenoidea	4 \pm 0,0
Húmero	
Epis proximal	10,5 \pm 0,1
Epis distal	6,1 \pm 0,3
Radio	
Epis proximal	7,7 \pm 0,2
Epis distal	8,2 \pm 0,1
Cúbito	
Epis proximal	7,5 \pm 0,1
Epis distal	7,6 \pm 0,1
Accesorio	4 \pm 0,0
Metacarpianos 2-5	6 \pm 0,0
Falange F1 (ma y mp)	5 \pm 0,0
Fémur	
Epis distal	7,8 \pm 0,1
Tibia	
Epis proximal	8,8 \pm 0,1
Epis distal	7,6 \pm 0,1
Tuberosidad de la tibia	10,1 \pm 0,4
Peroné	
Epis proximal	9 \pm 0,0
Epis distal	7,7 \pm 0,2
Calcáneo	5 \pm 0,0
Metatarsianos 2-5	6,1 \pm 0,1

Ma: Miembro anterior; mp: miembro posterior. F1: falange proximal.

Discusión

En los cachorros de este estudio, el aumento en el peso y la altura se registró hasta los 7 meses de edad, siguiendo una curva de tipo logarítmica, con un incremento final más marcado. Este resultado coincide con las curvas de crecimiento normal reportadas previamente para caninos domésticos (Sait y col., 2017). Es interesante destacar que el arrivo a la altura máxima coincide con los cierres fisarios

registrados en distal del humero, cubito, tibia y peroné y en proximal de radio y cubito. Considerando que las razas grandes y gigantes alcanzan el peso adulto entre los 11 y los 15 meses de edad, el presente estudio da cuenta de la precocidad de los perros de talla pequeña en la finalización del crecimiento (Hawthorne y col., 2004; Sait y col., 2017).

En este estudio, el cierre de todos los cartilagos fisarios del esqueleto apendicular se encontró completo a los 11 meses de edad. Este hallazgo difiere de los 14 meses reportados para Beagles y los 13-14 meses reportados para Greyhounds (Smith, 1960; Yonamine y col., 1980). Esto puede explicarse por las altas tasas de crecimiento descritas en las razas pequeñas en este y otros reportes (Forsberg, 2007; Sait y col., 2017). La meseta en la curva de crecimiento de los caninos se ha definido como el momento en el que la longitud de los huesos largos y, por ende, la altura, dejan de incrementarse significativamente (Root Kustritz y col., 1997). Por otra parte, se entiende como madurez ósea a la instancia en la cual las fisas de un hueso se encuentran cerradas, sumado a que su longitud medida en la proyección radiográfica medio-lateral no aumentó en las sucesivas mediciones (Root Kustritz y col., 1997). Estas dos instancias fueron claramente identificadas en estos animales, ocurriendo la primera a los 7 meses de vida y la segunda a distintas edades cronológicas, según la fisis.

Este es el primer estudio donde se muestra que el desarrollo puberal temprano reportado en perros de talla pequeña (Forsberg, 2007) se relaciona estrechamente con la precocidad del desarrollo óseo en esta población canina. Otro de los factores que impactan en el grado de desarrollo en un animal corresponde a factores genéticos. En un estudio previo, se compararon los perfiles genéticos de los

cartilágeos de crecimiento de una raza grande y de una pequeña. Allí se observó una expresión genética diferente en aquellos genes involucrados en la formación ósea (Teunissen y col., 2017). El orden cronológico en el que ocurrieron los retrasos físicos en estos perros coincide con estudios previos en Greyhounds (Sumner-Smith, 1966).

En este estudio, se encontró un efecto de la llegada a la pubertad sobre el retraso físico de la fisia proximal del humero y la fisia distal de radio. Esto puede deberse al efecto de las hormonas sexuales en estos tejidos (Nelson y col., 2005; van der Eerden y col., 2003). Además, estos hallazgos coinciden con reportes en felinos donde se observaron retrasos en el cierre de la fisia radial en animales castrados (Root Kustritz y col., 1997). A su vez, esto mismo se reportó en caninos bajo tratamiento contraceptivo donde se observó un retraso en el cierre de la fisia proximal del humero (Kayá y col., 2015). Es importante tener en cuenta que la fisia proximal del humero y distal del radio aportan un 80% y 70% de la longitud total de esos huesos, respectivamente (Riser, 1965; Shapiro, 1987). Según los resultados obtenidos en este estudio, el crecimiento más acelerado del humero y del radio se produjo hasta los 6 meses de edad. Este periodo constituye una ventana de mayor susceptibilidad, donde injurias o tratamientos farmacológicos podrían comprometer la longitud final del hueso. Por esto, se debe considerar especialmente el impacto que puedan tener los tratamientos médicos y/o quirúrgicos, contraceptivos o no, sobre el desarrollo de estos huesos, principalmente en el periodo de mayor crecimiento de los mismos.

Se concluye que, en perros de razas chicanas, el cierre de los cartilágeos de crecimiento se completa a los 11 meses de edad. En estos animales, la ocurrencia

de la pubertad influyen el cierre de la fisura proximal del húmero y de la fisura distal del radio. Es importante considerar dichos resultados para una mejor evaluación radiológica en cachorros y para determinar el impacto que ciertos tratamientos médicos y quirúrgicos implementados durante el desarrollo puberal canino puedan tener sobre el desarrollo esquelético.

Bibliografía

1. Baker ER. Bodyweight and the initiation of puberty. *Clin Obstet Gynecol* 1985; 28:573-579.
2. Bourguignon JP. Growth and timing of puberty: reciprocal effects. *Hormone Research in Pediatrics* 1991; 36: 131-135.
3. Castilla V, Márquez A, Rodríguez M, Lalla J. Parámetros bioquímico-endocrinos de utilidad en la etapa del crecimiento y desarrollo del Ovejero Alemán, Dobermán y Gran Danés. *Archivos de Medicina Veterinaria* 1997; vol 29.
4. Forsberg CE. Biology of reproduction of the dog and modern reproductive technology. En: *The Genetics of the dog*, 2nd Ed. 2012, Eds Ostrander and A. Rubinsky. p. 295-314.
5. Gilsanz, V. and Raitb, O. (2005). *Human Bone Age, a Digital Atlas of Skeletal Maturity*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 96 pp.
6. Johnston SD, Root-Kustritz MV, Olson PNS, eds 2001. The feline estrous cycle. En: *Canine and feline theriogenology*, Saunders, Philadelphia, pp. 396-405.

7. Kaya D, Schäfer-Somi S, Kurt B, Kuru M, Kaya S, Kacar C, Aksay O, Aslan S. Clinical use of deslorelin implants for the long-term contraception in prepubertal bitches: Effects on epiphyseal closure, body development, and time to puberty. *Theriogenology* 2015; 83:1147-53.
8. Kilborn SH, Trudel G, Uthoff N. Review of Growth Plate Closure Compared with Age at Sexual Maturity and Lifespan in Laboratory Animals. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science* 2002; 41:21-26.
9. Kondé EJ. Diseases of the immature skeleton. In: Thrall DE (ed.). *Textbook of veterinary diagnostic radiology*. 3rd Ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1998, pp. 131-144.
10. Mackie EJ, Tatarczuch L, Miriams M. The skeleton: a multi-functional complex organ. The growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *Journal of Endocrinology* 2011; 211: 109-121.
11. Marlot JP, Guerin Ch, Bégon D. Growth, testicular development and sperm output in the dog from birth to post pubertal period. *Andrologia* 1985; 17: 450-460.
12. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in girls. *Archives of Disease in Childhood* 1969; 44: 291-303.
13. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Archives of Disease in Childhood* 1970; 45: 13-23.
14. Nap R, Haxewinkel HAW, Voorhout G, Van der Brom WE, Goedeggbuure SA, Van T Klooster AFH. Growth and Skeletal

- Development in Great Dane Pups Fed Different Levels of Protein Intake. *The Journal of Nutrition* 1991; 121:S107-113.
15. Napp RC, Nazewinkel HAW. Growth and skeletal development in the dog in relation to nutrition; a review. *Veterinary Quarterly* 1994; 1: 50-59.
 16. Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J. Endocrine Regulation of the Growth Plate. *Hormone Research* 2005; 64: 157-165.
 17. Riser W, Shrier JF. Normal and abnormal growth of the distal foreleg in large and giant dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 1965; 6: 50-64.
 18. Root-Kustritz M, Johnston S, Olson P. The effect of prepubertal and postpubertal gonadectomy on radial physal closure in male and female domestic cats. *Vet Radiol Ultrasound* 1997; 38:42-47.
 19. Salt C, Morris PJ, German AJ, Wilson D, Lund EM, Cole TJ, Butterwick RE. Growth standard charts for monitoring body weight in dogs of different sizes. *PLoS ONE* 2017; 12(9): e0182064.
 20. Shapiro E. Epiphyseal disorders. *N Eng Med* 1987; 317: 1702-1710.
 21. Sumner-Smith G. Observations on epiphyseal fusion of the canine appendicular skeleton. *Journal of Animal Practice* 1966; 7: 303-311.
 22. Teunissen M, Remers EM, van Leenen D, Groot Koerkamp MJ, Meij BP, Ablas J, Pennig LC, Miranda-Bedate A, Tryfonidou MA. Growth Plate Expression Profiling: Large and Small Breed Dogs Provide New Insights in Endochondral Bone Formation. *Journal Of Orthopaedic Research* 2018; 36:138-148.
 23. van der Eerden BCJ, Kärperlen M, Wit JM. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocrine reviews* 2003; 24:782-801.

24. Von Pfeil DJE, De Camp CE. The epiphyseal plate: physiology, anatomy and trauma. *Compendium Continuing Education for Veterinarians* 2009; 31: E1-E11.
25. Wörsé M, Dé-Lèvi S, Barnes KM, Galm RI, Abad V, Baron J. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98: 6874-6876.
26. Yonamine H, Ōgi N, Ishikawa T, Ichiki H. Radiographic studies on skeletal growth of the pectoral limb of the beagle. *Jpn J Vet Sci* 1980

CONCLUSIONES FINALES

Durante la pubertad felina y canina ocurren cambios morfológicos y funcionales progresivos, que pueden ser monitoreados mediante el uso de métodos complementarios de diagnóstico no invasivos. El uso de estas tecnologías permitió evidenciar la gradualidad de este proceso para las especies canina y felina.

En hembras caninas, las dimensiones de los ovarios y del útero, el número y tamaño de los folículos y el flujo sanguíneo intravarios y uterino aumentan hacia el inicio de la pubertad.

En hembras felinas, las dimensiones ováricas y uterinas, el número y tamaño de los folículos y el flujo sanguíneo intravarios y uterino también aumentan durante el desarrollo sexual.

En las gatas postpúberes, el número y el diámetro folicular, así como también los flujos sanguíneos ováricos y uterinos se modificaron durante e inmediatamente después del estró en ciclos anovulatorios. Las modalidades ultrasonográficas bidimensional y Doppler resultaron adecuadas para evaluar los cambios morfológicos y hemodinámicos involucrados en la remodelación cíclica de los tejidos ováricos y uterinos que se produce durante y después del crecimiento folicular.

La evaluación ultrasonográfica del tracto reproductivo demostró ser una herramienta eficaz para evaluar el grado de desarrollo sexual en estas especies. Conocer las variaciones normales morfológicas y circulatorias del tracto reproductivo que ocurren antes y durante la pubertad canina y felina, nos permitirá

detectar posibles cambios patológicos y mejorar así el diagnóstico de enfermedades en esta etapa de la vida.

Los resultados de esta tesis abren un camino en las posibilidades de estudio sobre dinámica fisiológica desde etapas tempranas de la vida de estas especies, importante también en el desarrollo de biotecnologías de la reproducción para aquellas especies de caninos y felinos en peligro de extinción.

Finalmente, en perros de razas chucas evaluados radiográficamente, se concluye que el cierre de los cartilagos de crecimiento se completo a los 11 meses de edad. En estos animales, la ocurrencia de la pubertad influye el cierre de la fisura proximal del humero y de la fisura distal del radio. Los hallazgos radiológicos obtenidos permiten comprender con mayor detalle el desarrollo esquelético de los caninos de talla pequeña; mejorar el diagnóstico radiológico y contar con rangos de valores fisiológicos para poder evaluar el impacto que puedan tener distintos tratamientos médicos y/o quirúrgicos sobre el cierre fisiario.

En síntesis, los métodos complementarios de diagnóstico utilizados en este trabajo de tesis demostraron ser confiables y eficaces a la hora de evaluar los cambios que ocurren en el tracto reproductivo durante el desarrollo puberal normal en hembras caninas y felinas, como así también en el desarrollo esquelético de caninos de talla pequeña durante el primer año de vida.