

L'INDAGINE ECOGRAFICA DELL'ATTIVITÀ OVARICA NELLA CAGNA DURANTE IL CICLO ESTRALE

G. SPATTINI¹, R. GIACONELLA², F. DE RENSIS

Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma, Italy

¹*Clinica Veterinaria di Castellarano, Castellarano, Reggio Emilia, Italy*

²*Centro Veterinario Tiburtino, Roma, Italy*

Riassunto

Nella cagna è possibile studiare lo sviluppo follicolare ovarico mediante indagine ecografica. Nei primi giorni del proestro nell'ovaio, organo ecograficamente poco differenziabile dai tessuti circostanti, si iniziano ad intravedere i follicoli, strutture anecogene di 1-2 mm che si accrescono fino all'ovulazione raggiungendo i 6-10 mm. L'intervallo temporale tra l'ovulazione dei primi e degli ultimi follicoli può estendersi per 24-36 ore. Lo sviluppo follicolare e l'ovulazione sono asincrone tra le due ovaie. I corpi lutei nelle prime fasi di formazione spesso presentano del materiale anecogeno al loro interno che può renderli difficilmente distinguibili dai follicoli in accrescimento. Nonostante ciò, mediante indagine ecografica, è possibile studiare l'attività ovarica durante il proestro e l'estro e determinare con buona approssimazione il momento dell'ovulazione; questa tecnica è un ottimo ausilio nella pratica veterinaria per determinare quando effettuare l'inseminazione.

Summary

In the dog it is possible to investigate ultrasonographically ovarian follicular development. During the first two days of proestrus, it is difficult to visualise the ovary using ultrasound. However, from day two of proestrus, follicles may be seen as 1-2 mm diameter anechoic structures. These cystic structures will grow to 6-10 mm before they ovulate. The interval between ovulation of the first and the last follicle is 24-36 hours. Follicular development and ovulation in both ovaries is asynchronous. The corpora lutea at the first stages of development are usually anechoic and therefore it is difficult to differentiate them from preovulatory follicles. From the above considerations, it is possible to conclude that it is difficult to determine ultrasonographically the exact moment of ovulation in bitch. However this technique is one of the most useful methods to determine the best time for insemination.

INTRODUZIONE

Nella cagna, come in altre specie di animali domestici, per ottenere delle buone percentuali di gravidanza è necessario effettuare l'inseminazione nel momento ottimale del ciclo. Questa esigenza diventa più accentuata quando si utilizza il seme congelato (la vitalità del seme congelato è di circa 2 giorni contro i 5-6 giorni del seme fresco) o quando il numero di monte disponibili è limitato.

Diversi metodi sono oggi utilizzabili per individuare il momento migliore per l'inseminazione quali la conta empirica del giorno del ciclo dal momento in cui si visualizzano le perdite vaginali siero-emorragiche, l'esame citologico dell'epitelio vaginale, il comportamento della cagna, la de-

terminazione dei livelli ematici di progesterone o delle variazioni della conducibilità del muco vaginale (Gunzel et al., 1986; Jeffcoate et al., 1989; Linde-Forseberg, 1991; Fontbonne et al., 2001). Questi metodi, pur essendo di facile applicazione, non sono molto accurati mentre altri, quali la determinazione del picco di LH (Olson et al., 1982; Concannon et al., 1989), pur essendo più accurati, sono di difficile applicazione nella pratica quotidiana.

Mediante l'ecografia è possibile seguire lo sviluppo follicolare e determinare il momento dell'ovulazione nella cavalla, nella bovina e nella scrofa (Ginther et al., 1986; Pierson et al., 1988; Soede et al., 1992). Nella specie canina l'indagine ecografica dello sviluppo follicolare e la determinazione del momento dell'ovulazione sono ancora in fase di studio. Negli anni '80 diversi autori riportano che le ovaie della cagna sono raramente evidenziabili mediante l'ecografia (Barr et al., 1988; Wrigley et al., 1989). England et al. (1989b), utilizzano come marker delle sfere metalli-

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 5/12/2002 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 17/1/2003”.

che chirurgicamente applicate alle ovaie e concludono che individuare le ovaie nella cagna durante il ciclo estrale è difficile, soprattutto l'ovaio destro. Fin dagli anni '90, grazie all'aumentata risoluzione delle apparecchiature ecografiche è stato possibile visualizzare i follicoli durante il loro sviluppo senza particolari difficoltà (Rivers, 1991; England, 1993; Silva, 1996). Risulta però ancora difficile determinare il numero (England et al., 1993) e le dimensioni dei follicoli preovulatori in quanto alcuni follicoli ovulano quando raggiungono le dimensioni di 6 mm mentre altri ovulano intorno ai 10 mm (Wallace et al., 1992). Secondo alcuni autori l'ovulazione può essere osservata ecograficamente e consiste in una rapida diminuzione delle dimensioni dei follicoli (Inaba et al., 1984; Wallace et al., 1992). Queste osservazioni non sono state successivamente confermate e altri autori (England et al., 1993; Silva et al., 1996) riportano che l'ovulazione nella cagna è di difficile determinazione in quanto la maggior parte dei follicoli non collassa rapidamente, come invece avviene in altre specie domestiche poliovulatorie come quella suina (Soede et al., 1998). Inoltre nella cagna l'ovulazione è asincrona, con un intervallo tra i primi e gli ultimi follicoli anche superiore alle 24 ore (Boyd et al., 1993; Silva et al., 1996). Ecograficamente i follicoli preovulatori possono essere confusi con corpi lutei in formazione in quanto quest'ultimi frequentemente presentano al loro interno una cavità ripiena di liquido quindi anecogena (England et al., 1989a; Silva et al., 1996). Infine, non è infrequente lo sviluppo di strutture cistiche che complicano il quadro ecografico dell'ovaio (Wallace et al., 1992).

Secondo alcuni autori nella cagna più che poter definire il momento dell'ovulazione si può dedurre se questa sia già avvenuta (Hayer et al., 1993) rilevando la diminuzione del numero dei follicoli (Wallace et al., 1992) e la comparsa di strutture luteiniche (England et al., 1993; Boyd et al., 1993).

Lo scopo di questo lavoro è quello di descrivere l'indagine ecografica dell'attività ovarica durante il proestro e l'estro nella specie canina e la determinazione del momento migliore per l'inseminazione.

LE FASI DELLO SVILUPPO FOLLICOLARE NELLA CAGNA

Nella cagna, la forma iniziale del gamete femminile è il follicolo primordiale che compare dal primo mese dopo la nascita ed è una struttura composta dall'ocita primario circondato da uno strato di cellule squamose epiteliali definite cellule follicolari. Lo stadio di sviluppo successivo è quello di follicolo primario (o preantrale o unilaminare) in cui lo strato di cellule squamose epiteliali viene sostituito da uno strato di cellule epiteliali cuboidali. Nel follicolo secondario l'ocita è circondato da uno strato di cellule epiteliali poliedrali definite cellule della granulosa e nel follicolo terziario l'ocita e lo strato di cellule della granulosa sono circondati da una membrana basale. All'esterno di questa membrana si forma uno strato di cellule stromali dette cellule della teca. Man mano che il follicolo terziario si sviluppa le cellule della granulosa producono del liquido espandendo la cavità che contiene l'ocita. Questo liquido va aumentando fino a formare una struttura detta antra ed il follicolo a questo stadio viene definito follicolo

antrale (o di Graaf). Dal punto di vista ecografico le strutture follicolari non sono distinguibili dallo stroma ovarico fino a quando non si forma l'antra ripieno di liquido ed i follicoli raggiungono dimensioni di 1-2 mm, questo avviene in genere durante i primi giorni del proestro. Lo stadio finale dello sviluppo del follicolo ovarico è l'ovulazione a cui segue la formazione dei corpi lutei. Dopo circa 40-50 giorni dall'ovulazione i corpi lutei regrediscono e si formano i corpi albicanti costituiti da un residuo di tessuto connettivo cicatriziale non riconoscibile ecograficamente.

LA DETERMINAZIONE DEL MOMENTO DELL'INSEMINAZIONE ED IL RUOLO DELL'INDAGINE ECOGRAFICA

Nella cagna, a differenza delle altre specie domestiche, al momento dell'ovulazione sono estrusi oociti primari che per diventare oociti secondari e quindi fertilizzabili necessitano di un periodo di maturazione di 2-4 giorni (Tsutsui, 1975; Concannon et al., 1986a). Una volta maturati, gli oociti rimangono vitali per altri 2-5 giorni (Lein, 1986; Concannon et al., 1989). Considerando che il seme canino nelle vie genitali femminili si mantiene vitale per 4-7 giorni (Concannon et al., 1983; TsuTsui et al., 1989a,b) e che il picco di LH precede l'ovulazione di 36-50 ore (Concannon et al., 1977, 1986b), il momento migliore per l'inseminazione si ha 4-5 giorni dopo il picco dell'LH e quindi subito dopo l'ovulazione (Fig. 1).

Nella pratica clinica si segue il ciclo della cagna dal momento in cui il proprietario nota le prime perdite sierose emorragiche. A questo punto si determina in quale stadio del calore la cagna si trova e con la migliore approssimazione possibile il momento dell'ovulazione. Per fare questo la cagna viene sottoposta a visita ginecologica, striscio vaginale ed ecografia di utero ed ovaie.

Nella cagna il primo giorno del proestro può essere definito come il primo giorno in cui si rilevano delle perdite vulvari sierose ematiche (Kooistra et al., 1999). Il proestro è caratterizzato da edema vulvare, presenza di perdite sierose ematiche vaginali, mancata accettazione del maschio, progressiva cheratinizzazione dell'epitelio vaginale e livelli di progesterone inferiori a 5 ng/ml (Zoldag et al., 2001). Il primo giorno dell'estro può essere definito come il primo giorno in cui la cagna accetta il maschio (Silva et al., 1996; Kooistra et al., 1999) ed è caratterizzato dalla diminuzione dell'edema vulvare e delle perdite vaginali, accettazione

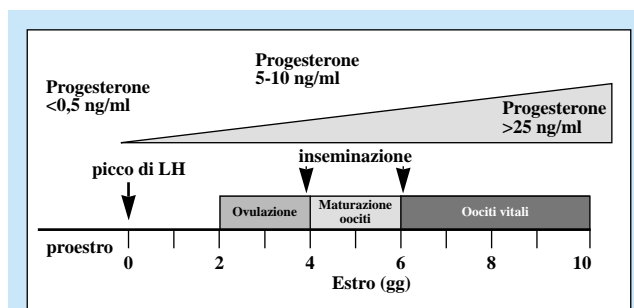


FIGURA 1 - Picco di LH, livelli ematici di progesterone, ovulazione, maturazione degli oociti, con indicato il momento migliore per l'inseminazione.

del maschio, massima cheratinizzazione dell'epitelio vaginale e livelli di progesterone superiori a 5 ng/ml (Zoldag et al., 2001). Con l'inizio dell'estro la percentuale di cellule cheratinizzate nello striscio vaginale supera il 60%.

Nella cagna il proestro dura in media 9 giorni con variazioni che vanno dai 3 ai 21 giorni (Tsutsui et al., 1989a). L'estro dura in media 9 giorni con variazioni che possono andare dai 2 ai 27 giorni (Concannon et al., 1986a). La variabilità della durata del proestro e dell'estro rende difficile predire il momento dell'ovulazione (Lein, 1986; Concannon, 1986a).

Citologicamente si segue la cagna dal terzo giorno del proestro, poi a giorni alterni fino a che la percentuale delle cellule cheratinizzate nello striscio non raggiunge il 60% in quanto a questo punto si passa dalla fase di proestro a quella di estro. L'esame citologico vaginale è molto utile per determinare se la cagna è nella fase di proestro o di estro ma non permette di determinare quando avviene l'ovulazione.

Poiché l'ovulazione avviene 36-50 ore dopo il picco preovulatorio di LH (Concannon et al., 1977, 1986b), la valutazione dei livelli ematici di questo ormone permetterebbe di determinare con precisione il momento dell'ovulazione. Il picco preovulatorio di LH nella cagna dura 24-36 ore e consiste in un aumento dei livelli di questo ormone di 20-40 volte rispetto a quelli osservabili durante il proestro: si passa infatti dai 2-5 ng/mL durante il proestro ai 20-50 ng/mL durante il picco preovulatorio (Concannon et al., 1986, 1989). Purtroppo il dosaggio dell'LH canino è complesso, è costoso, difficilmente reperibile e sono necessari prelievi di sangue seriali con un intervallo massimo di 12 ore.

La determinazione dei livelli di progesterone è più semplice: i livelli di progesterone sono inferiori ai 2 ng/ml durante il proestro, e si aggirano intorno ai 5-10 ng/ml al momento dell'ovulazione. Nel giro di una settimana dopo l'ovulazione arrivano a superare i 15-30 ng/ml (Concannon et al., 1986; Fontbonne, 2001). Per cui la fecondazione dovrebbe avvenire quando i livelli di progesterone si aggirano tra i 10-20 ng/ml. Se questi sono inferiori ai 4 ng/ml, l'ovulazione non è ancora avvenuta, se sono superiori ai 25 ng/ml è ormai avvenuta da oltre 6-7 giorni per cui la fecondazione sarebbe troppo tardiva. I limiti del dosaggio del progesterone sono la difficoltà di determinare con precisione le variazioni ematiche di questo ormone e la variabilità nei livelli ematici di progesterone tra i soggetti e tra le razze (Fontbonne et al., 2000).

L'ESAME ULTRASONOGRAFICO DELLE OVAIE NELLA CAGNA

Per effettuare l'esame ultrasonografico delle ovaie un apparecchio ecografico dotato di una sonda lineare o setoriale di 7,5 MHz è la strumentazione minima necessaria. La sonda lineare ha un'ottima risoluzione superficiale ma le grosse dimensioni la rendono poco maneggevole negli animali di piccola taglia per cui in questi casi la sonda setoriale può essere preferibile. Nelle cagne di grossa taglia od obese a causa della maggiore profondità delle ovaie può essere necessaria una sonda con frequenza minore anche se è preferibile non scendere al di sotto dei 5 MHz per non perdere troppo in dettaglio.

Visualizzazione dell'ovaio sinistro

Con l'animale in decubito laterale destro con il capo e gli arti rivolti verso l'operatore, si raso accuratamente il pelo sul fianco sinistro appena caudalmente all'ultima costola, distalmente ai muscoli sottolombari, cranialmente all'attaccatura della coscia, dorsalmente alla linea alba. Ecograficamente l'ovaio sinistro è localizzato in un'area delimitata anteriormente dal rene sinistro, ventralmente dai grossi vasi addominali (aorta e vena cava caudale), dorsalmente da tessuto muscolare e caudalmente si trovano anse del piccolo intestino. A volte il colon se disteso può sovrapporsi all'ovaio interferendo con la sua visualizzazione. Il digiuno di almeno 12 ore è preferibile per diminuire l'interferenza di questa struttura.

Visualizzazione dell'ovaio destro

Con l'animale in decubito laterale sinistro con la schiena rivolta verso l'operatore, si raso il pelo sul fianco destro a livello del penultimo spazio intercostale, distalmente ai muscoli sottolombari, cranialmente all'attaccatura della coscia, dorsalmente alla linea alba. Spesso la sonda necessita di una finestra acustica intercostale.

Ecograficamente l'ovaio destro è localizzato in un'area delimitata anteriormente dal rene destro, ventralmente dai grossi vasi addominali (vena cava caudale ed aorta), dorsalmente da tessuto muscolare e caudalmente si trovano anse del piccolo intestino.

Utilizzando il decubito laterale è più facile visualizzare l'ovaio sinistro rispetto al destro (osservazioni personali), mentre con l'animale in stazione quadrupedale, è più semplice identificare l'ovaio destro rispetto a quello sinistro (Wallace et al., 1992).

Monitoraggio ecografico dello sviluppo follicolare durante il proestro

Ecograficamente durante il primo ed il secondo giorno del proestro la localizzazione dell'ovaio può essere difficile in quanto se l'antra dei follicoli non è abbastanza ripieno di liquido e quindi questi non sono identificabili come puntiformi aree anecogene, l'ovaio risulta pressoché indifferenziabile dai tessuti circostanti. Dal secondo o terzo giorno del proestro i follicoli cominciano ad intravedersi come strutture anecogene mal definite di circa 1-2 mm (Fig. 2). Queste strutture si accrescono gradualmente fino a raggiungere, nell'arco di 4-5 giorni le dimensioni di 4-6 mm (Tab. 1). Con l'aumento delle dimensioni i follicoli sono facilmente identificabili ed appaiono come rotondegianti aree anecogene prive di parete propria (Fig. 3).

Monitoraggio ecografico dello sviluppo follicolare durante l'estro e l'ovulazione

Dal punto di vista ecografico nei primi giorni dell'estro i follicoli sono facilmente identificabili e le loro dimensioni si aggirano sui 4-8 mm ma con notevoli differenze soprattutto tra i follicoli delle due ovaie. L'ovulazione generalmente av-

viene quando i follicoli raggiungono le dimensioni di 9-10 mm ma spesso le dimensioni possono essere di soli 6-8 mm (Fig. 4) (Tab. 1). Ad ogni modo il momento preciso dell'ovulazione nella cagna non è ecograficamente ben identificabile in quanto, come England et al. (1993) riportano, solo il 6% dei follicoli collassano, il 32% dei follicoli non cambiano, il 62% dei follicoli sono rimpiazzati da aree di tessuto moderatamente ipoecogeno senza una parete propria, molto simile ai follicoli preovulatori. Alcuni follicoli sembrano non sviluppare in nessuna fase del ciclo una parete nettamente distinguibile dal parenchima ovarico mentre in alcune cagne i follicoli poco prima dell'ovulazione sviluppano una parete spessa anche un millimetro (Fig. 5) (England et al., 1993, Spattini et al., in preparazione). Questo sembra essere dovuto alla luteinizzazione preovulatoria dei follicoli ovarici carat-

teristica di questa specie. Inoltre l'ovulazione dei follicoli nella stessa ovaia è asincrona con un intervallo che può superare le 30 ore (Wildt et al., 1979; Silva et al., 1996).

Durante lo studio dei follicoli nella fase dell'ovulazione è possibile osservare all'interno di alcuni di questi una struttura iperecogena di 1-2 mm adesa alla parete follicolare che potrebbe essere un coagulo formatosi nel punto dove è avvenuta l'espulsione del follicolo (Fig. 6) (Spattini et al., in fase di pubblicazione). La presenza di tale struttura indica che il follicolo è ovulato.



FIGURA 2 - Ovaio sinistro, secondo giorno del proestro. I follicoli appaiono come piccole ed irregolari aree anaecogene nel parenchima ovarico.



FIGURA 3 - Ovaio destro, quarto giorno del proestro. I follicoli si evidenziano come aree ipoecogene di alcuni millimetri di diametro privi di parete distinguibile dal parenchima ovarico.

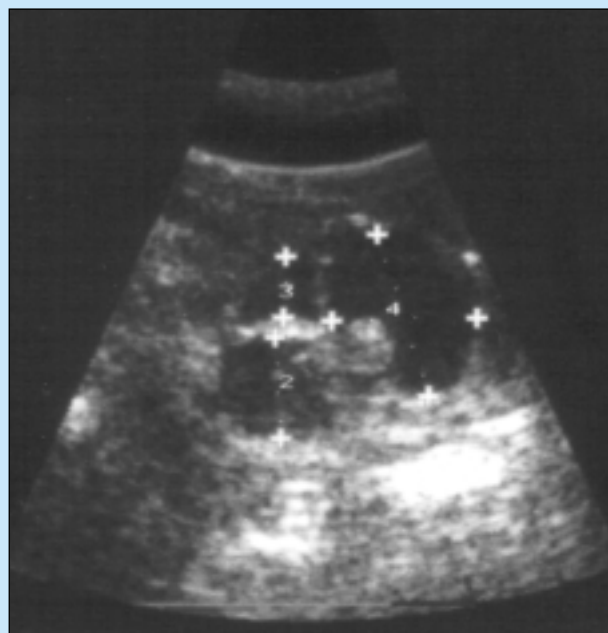


FIGURA 4 - Ovaio destro, secondo giorno dell'estro. I follicoli deformano l'ovaio. Marcate differenze tra i follicoli, anche di uno stesso ovaio, persistono per tutto il periodo dell'ovulazione.



FIGURA 5 - Ovaio destro, secondo giorno dell'estro. In questa cagna i follicoli possiedono una spessa parete che li separa nettamente dal resto del parenchima ovarico. L'ispessimento parietale è dovuto alla luteinizzazione preovulatoria dei follicoli.

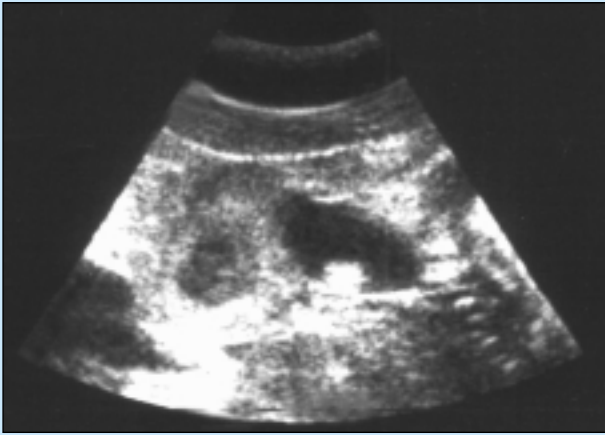


FIGURA 6 - Ovaio sinistro, sesto giorno dell'estro. Alla destra dell'immagine una struttura ovale anecogena contiene una struttura iperecogena eccentrica adesa alla parete, questo sembra essere un coagulo formatosi nel punto in cui l'ocita è stato estruso. Alla sinistra è evidente un corpo luteo di 4-5 giorni con centro irregolarmente ipoecogeno e spessa parete ecogena.



FIGURA 7 - Ovaio sinistro, nono giorno dell'estro. Alla destra dell'immagine è visibile una struttura ovale anecogena contenente una struttura eccentrica ecogena adesa alla parete. Tale struttura è la stessa della Fig. 6. Il fatto che l'area anecogena persista, aumenti di dimensioni e non siano presenti i cambiamenti visibili nella luteinizzazione del follicolo fanno pensare alla formazione di una cisti ovarica. Alla sinistra dell'immagine è visibile un'area irregolare anecogena che contorna l'ovaio riferibile a liquido periovarico.

Tabella 1

Diametro follicolare (mm) di 6 cagne Greyhound determinato mediante esame ecografico durante il periodo del proestro ed estro.
Giorno 0= primo giorno dell'estro.
La durata media del calore è stata di 14±2.7 giorni (range 11-16)

Stadio del ciclo (giorni dall'estro)	Giorni media + SD	Diametro (mm)	Range (mm) media+SD	n° follicoli/ovaio
proestro	-5	1,1±0,2	1,5-1,9	4,3±0,7
proestro	-3	3,1±0,4	2,1-4,2	3,2±0,4
proestro	-1	4,8±0,6	4,2-7,1	3,9±0,8
estro	0	7,2±0,8	5,3-10,1	3,9±0,7
estro	+2	8,3±0,9	7,2-11,1	3,3±0,9

Monitoraggio ecografico dell'ovaio dopo l'ovulazione

Nelle fasi iniziali dello sviluppo del corpo luteo è spesso presente una certa quantità di liquido siero-emorragico che nell'arco di alcuni giorni viene completamente riassorbito. La presenza di questo liquido può far confondere ecograficamente i corpi lutei emorragici con dei follicoli antrali; le differenze, non facilmente rilevabili, sono date da un modesto ispessimento della parete che appare quindi più ecogena rispetto alla parete di un follicolo antrale e, alcune volte, dalla presenza di materiale ipoecogeno fluttuante nella cavità che tende ad aumentare di ecogenicità col passare dei giorni. I corpi lutei dopo il quinto o sesto giorno dalla loro formazione, sono distinguibili dal parenchima ovarico in quanto appaiono come strutture rotondeggianti di 4-6 mm parenchimatose ed ecogene con centro irregolarmente ipoecogeno (Fig. 6). A questo stadio nelle ovaie possono apparire con una certa frequenza (20-30% dei casi) delle cisti follicolari che si rilevano come strutture anecogene che continuano a crescere dopo l'ovulazione; è ancora incerto se dal punto di vista endocrinologico siano funzionali. Anche la comparsa di liquido periovarico è un riscontro frequente (Fig. 7).

L'ovaio regredisce fino a ritornare la struttura maldefinita ed isoecogena rispetto ai tessuti circostanti in circa 20-30 giorni. Lo studio ecografico dell'ovaio durante i periodi di diestro ed anestro può essere difficile.

CONCLUSIONI

Nella cagna è possibile determinare ecograficamente lo sviluppo dei follicoli ovarici durante il proestro e l'estro. Nello stesso ovaio esiste un intervallo di 20-30 ore tra l'ovulazione dei primi e degli ultimi follicoli e le due ovaie sono asincrone tra di loro. I corpi lutei in formazione sono anecogeni quindi possono essere confusi con i follicoli preovulatori. I corpi lutei impiegano alcuni giorni per divenire riconoscibili come strutture parenchimatose ecogene con centro irregolarmente ipoecogeno. L'esame ecografico dello sviluppo follicolare ovarico è un utile ausilio, affiancato da altre metodiche, per determinare il momento migliore per l'inseminazione della cagna.

Ringraziamenti

Si ringraziano i Dott.ri M. Boschini e M. Brianza per la collaborazione prestata al lavoro ed il Cinodromo di Roma per l'approvvigionamento degli animali.

Parole chiave

Ecografia, ovaio, follicolo, corpo luteo, cagna.

Key words

Ultrasonography, ovary, follicle, corpus luteum, bitch.

Bibliografia

1. Barr FJ. The use of ultrasound in the dog. In Grunsell GSG, raw ME, Hill FWG (eds). *The Veterinary Annual*, 28th issue, Boston, Sientecnica, 142-148, 1988.
2. Boyd JS, Renton JP, Harvey MJA, Nickson DA, Eckersall PD, Ferguson JM. Problems associated with ultrasonography of the canine ovary around the time of ovulation. *J Repr Fert* 47:101-105, 1993.
3. Concannon PW, Hansel W, McEntee K. Changes in LH, progesterone and sexual behaviour associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol Reprod* 17:604-613, 1977.
4. Concannon PW, Whaley S, Lein D. Canine gestation length: variation related in time of mating and fertile life of sperm. *Am J Vet Res* 44:1819-1824, 1983.
5. Concannon PW. Canine physiology of reproduction. In: *Small animal reproduction and infertility*. Philadelphia: Lea and Febiger (eds), 23-77, 1986a.
6. Concannon PW. Canine pregnancy and parturition. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 16:453-475, 1986b.
7. Concannon PW, McCann JP, Temple M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fert., (Suppl)* 39:3-26, 1989.
8. England GCW, Allen WE. The ultrasonographic and histological appearance of the canine ovary. *J Reprod Fert, Supplement* 39:91-100, 1989a.
9. England GCW, Allen WE. The ultrasonographic and histological appearance of the canine ovary. *Veterinary Record* 123, 555-556, 1989b.
10. Engalnd CGW, Yeager AE. Ultrasonographic appearance of the ovary and uterus of the bitch during oestrus, ovulation and early pregnancy. *J. Reprod. Fert., (suppl)* 107-117, 1993.
11. Fontbonne A., Buff S., Garnier F. Recenti dati di fisiologia ed endocrinologia sessuale nella specie canina. *Summa*, 2:17-22, 2001.
12. Fontbonne A., Buff S., Lepercq MF. Artificial insemination with frozen semen in the bitch: influence of progesterone level, inseminating dose and number of insemination performed in the same bitch, 4th International Symposium in Canine and Feline Reproduction, Oslo, 2002.
13. Ginther OJ. *Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare*. Cross Plains, Wis. Equine Services, 1986.
14. Gunzel AR, Koivisto P, Fougner JA. Electrical resistance of vaginal secretion in the bitch. *Theriogenology* 25:559-570, 1986.
15. Hayer P, Gunzel-Appel AR, Luerksen D, Hoppen HO. Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and the early luteal phase in the bitch. *J Rerpod Fert Supplement* 47:93-1000, 1993.
16. InabaT, Matsui N, Shimazu R Use of echography in bitches for detection of ovulation and pregancy. *Vet Rec* 115:276-280, 1984.
17. Jeffcoate I, Lindsay FEF. Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *J Reprod Fert* 39: 276-287, 1989.
18. Kooistra HS, Okkens AC, Bevers MM, Popp-Snijders C, Van Haaften B, Dieleman SJ, Schoemaker J. Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone during different phases of the oestrus cycle and anestrus in beagle bitches. *Biol of Reprod*, 60: 65-71, 1999.
19. Lein DH. Infertility and reproductive diseases in bitches and queens. In: Roberts SJ (eds) *Veterinary obstetrics and genital diseases*, *Theriogenology*, 3rd ed. Woodstock, Vermont: SJ Roberts, 675-683, 1986.
20. Linde-Forseberg C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet Clin North Am. Small An Pract*, 21:467-485, 1991.
21. Olson PN, Bowen RA, Beheredent M. Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrous, proestrus and oestrus. *Biol of Reprod.*, 27:1196-1201, 1982.
22. Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology*, 29:21-37, 1988.
23. Rivers B, Johnson GR. Diagnostic imaging of the reproductive organs in the bitch. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 21:437-466, 1991.
24. Silva LDM, Onclin K, Verstegen JP. Assessment of ovarian changes around ovulation in bitches by ultrasonography, laparoscopy and hormonal assays. *Vet Rad & ultras* 37:313-320, 1996.
25. Soede NM, Noordhuizen JPTM, Kemp B. The duration of ovulation in pigs, studied by transrectal ultrasonography, is not related to early embryonic diversity. *Theriogenology*, 38:653-666, 1992.
26. Soede NM, Hazelenger W, Kemp B. Follicle size and the process of ovulation in sows as studied with ultrasound. *Reproduction in Domestic Animals*, 33:3-4, 239-244, 1998.
27. Tsutsui T. Studies on the reproduction in the dog. VI. Ovulation rate and transuterine migration of the fertilised ova. *Jpn J Anim Reprod* 21:98-101, 1975.
28. Tsutsui T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilisation in dogs (Suppl) 39:269-273, 1989.
29. Tsutsui T, Kawakami E, Murao I. Transport of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch: observation through uterine fistulas. *Jpn J Vet Sci* 51:560-590, 1989.
30. Wallace S.S., Mahafey MB, Miller DM, Thompson FN, Prabir KC. Ultrasonographic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the estrus cycle. *Am J Vet Res*, 53:209-215, 1992.
31. Wildt DE, Panko WB, Chakraborty PK, Seager SWJ. Relationship of serum estrone, estradiol 17beta and progesterone to LH, sexual behaviour and time of ovulation in the bitch. *Bio of Reprod* 20:648-658, 1979.
32. Wrigley RH, Finn ST. Ultrasonography of canine uterus and ovary. In Kirk RW (ed): *Current Veterinary Therapy X*. Philadelphia, WB Saunders, 1239-1242, 1989.
33. Zoldag L, Fekete S, Csaky I, Bersenyi A. Fertile estrus induced in bitches by bromocriptine, a dopamine agonist: a clinical trial. *Theriogenology*, 55:1657-1666, 2001.