

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



“DETERMINACIÓN DE LH EN PERRAS POR LA TÉCNICA DE
INMUNO-MIGRACIÓN RÁPIDA Y ESTUDIO
COMPLEMENTARIO CON CITOLOGÍA VAGINAL EXFOLIATIVA”

POR

FRIDA ESPERANZA BURCIAGA MILÁN

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

OCTUBRE DE 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



"DETERMINACIÓN DE LH EN PERRAS POR LA TÉCNICA DE INMUNO-
MIGRACIÓN RAPIDA Y ESTUDIO COMPLEMENTARIO DE CITOLOGÍA
VAGINAL EXFOLIATIVA"

POR:

FRIDA ESPERANZA BURCIAGA MILÁN

ASESOR PRINCIPAL:

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir "Rascón Díaz".

M.V.Z. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

COORDINACIÓN DE LA DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir "Ramón Alfredo Delgado González".

M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

OCTUBRE DE 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



“DETERMINACIÓN DE LH EN PERRAS POR LA TÉCNICA DE INMUNO-
MIGRACIÓN RÁPIDA Y ESTUDIO COMPLEMENTARIO CON CITOLOGÍA
VAGINAL EXFOLIATIVA”

POR
FRIDA ESPERANZA BURCIAGA MILÁN

JURADO:

PRESIDENTE: M.V.Z. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

VOCAL: M.C.V. MARÍA HORTENSIA CEPEDA ELIZALDE

VOCAL: M.C. ESEQUIEL CASTILLO ROMERO

VOCAL SUPLENTE: M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

OCTUBRE 2014

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por la bendición de tener a mi lado a mis padres.

Por poner en mí camino a mis profesores y a su vez amigos, quienes me han guiado y apoyarme hasta ahora.

A MIS PADRES

Isidro Burciaga González.

Ma. Esperanza Milán Ramírez.

Gracias por el apoyo incondicional que me brindaron, por hacer de mi la mujer que ahora soy, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible, les agradezco el estar a mi lado en mis logros y tropiezos, por nunca dejarme sola.

Gracias por su gran ejemplo de fortaleza, tenacidad y superación, no hay palabras ni agradecimientos que expresen lo feliz que me hace tenerlos a mi lado.

A MIS PROFESORES

En especial a mi presidente el M.V.Z. Carlos Raúl Rascón Díaz a quien admiro y aprecio mucho, gracias por brindarme todos sus conocimientos y amistad durante estos 5 años.

A mis sinodales, quienes me apoyaron en este logro, M.C. Ma. Hortensia Cepeda Elizalde, M.C. Esequiel Castillo Romero, M.C.V. Ramón Alfredo Delgado González.

A todos mis maestros de la UAAAN, con quienes hice una gran amistad, a muchos de ustedes los recordare siempre, porque fueron y serán parte importante en mi vida.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATUR	2
	2.1. Anatomía del sistema reproductor de la perra	2
	2.2. Ciclo estral y endocrinología en la perra	4
	2.3. Hormonas y fisiología reproductiva de la perra	10
	2.4. Ciclo ovárico	19
	2.5. Citología vaginal exfoliativa	22
III.	JUSTIFICACIÓN	33
IV.	OBJETIVOS	34
	4.1. Objetivo general	34
	4.2. Objetivos específicos	34
V.	HIPOTESIS	34
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS	35
	6.1. Descripción del experimento	35
	6.2. Materiales	35
	6.3. Métodos	36
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases del ciclo estral	4
Figura 2. Toma de muestra para la citología vaginal	26
Figura 3. Impresión de las células en un portaobjetos.....	27
Figura 4. Superficie ventral del vestíbulo vaginal.....	28
Figura 5. Citología vaginal al inicio del proestro.....	28
Figura 6. Citología vaginal con proestro intermedio.....	29
Figura 7. Citología vaginal al final del proestro	29
Figura 8. Citología vaginal al principio del estro.....	30
Figura 9. Citología vaginal con estro intermedio.....	30
Figura 10. Citología vaginal al final del estro	31
Figura 11. Citología vaginal con diestro intermedio	31
Figura 12. Citología vaginal en anestro	32

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tabla experimental.....	39
Cuadro 2. Resultados	40

RESUMEN

La predeterminación del día en que la perra va a ovular nos permite asegurar la elección del o los días en que debe ser el momento óptimo para la concepción. Para determinar el día preciso del pico preovulatorio es necesario saber cuando ocurre la elevación de LH, este es el evento central del ciclo estral, debido a que este aumento de la LH ocurre en etapa del proestro, por lo tanto nos indicara que la perra tendrá una ovulación dentro de las 48 a 72 horas próximas. Dentro de los métodos existentes para determinar el día de la ovulación se utilizó la prueba de Inmuno-Migración Rápida para LH. En este caso se realizó el estudio comparándolo con la citología vaginal exfoliativa, para ello se realizaron citologías vaginales con la finalidad de encontrar el momento óptimo para correr la prueba de Inmuno-Migración Rápida para LH. De las 10 hembras en el estudio, al 30% se les realizó una citología vaginal, a su vez, se fueron tomando pruebas diarias de LH hasta llegar al resultado final donde se mostró el pico preovulatorio de LH; en este caso en el análisis se obtuvo como promedio el uso de 4 pruebas de LH por perra. Al 20% de las muestras se le realizaron 3 citologías y de 1 a 2 pruebas de LH. Al 50%, se les monitoreo mediante 4 a 7 citologías vaginales hasta encontrar la mayoría células escamosas y así proceder a realizar la medición de LH, y en estos casos se utilizó solo una prueba de LH. La utilidad del presente estudio radica en que la certeza del diagnóstico, utilizando ambas técnicas, permite un ahorro económico para los criadores de perros.

PALABRAS CLAVE: Hormona luteinizante, LH, ciclo estral, ovulación, citología vaginal exfoliativa, perras, prueba de Inmuno-Migración Rápida.

I. INTRODUCCIÓN

El ciclo reproductivo de la perra puede dividirse en cuatro estadios: Proestro, estro, diestro y una etapa de inactividad sexual o anestro (Wanke y Gobello, 2006). La hembra canina representa un modelo reproductivo biológicamente diferente en comparación con otras especies por varias razones: La perra se clasifica como un animal monoéstrico que presenta de uno a tres ciclos estrales en un año con un intervalo de 3 a 9 meses. De 24 a 48 horas de iniciado el estro, la LH va a permitir la ovulación liberando así el o los óvulos en fase de ovocito primario el cual alcanza su madurez aproximadamente 108 horas después de la ovulación (Tsutsui, 1989).

El proestro inicia con una descarga vulvar hemorrágica hasta la primera aceptación del macho (Tsutsui, 1989; Concannon, 2011). En el estro, el comportamiento de la perra cambia de la agresividad a la pasividad (Concannon, 2011) y finaliza cuando la hembra no acepta el apareamiento. En el diestro la vulva retoma su tamaño normal y ya no se observa agrandada o flácida (Wanke y Gobello, 2006; Feldman y Nelson, 2007).

Existen varios métodos para la determinación de las fases del ciclo estral de la perra. Uno de ellos es la citología vaginal, la cual se basa en las características celulares del epitelio escamoso de la vagina, identificando las células basales, intermedias, superficiales y escamas (De Buen, 2001). Otras técnicas se basan en la medición de la LH (Root, 2001).

Con la finalidad de mejorar el manejo reproductivo de la perra, es importante identificar con exactitud el día de la ovulación. En el presente estudio se realizó la prueba de Inmuno-Migración Rápida para LH, junto con citología vaginal exfoliativa, con el objetivo de tener una guía para decidir el día en que esta debe ser servida por el macho o realizar la inseminación.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Anatomía del sistema reproductor de la perra.

Vulva. Es el orificio urogenital externo de la perra, está formado por dos labios que forman una comisura dorsal y una ventral, los cuales tienen una mucosa lisa.

Clítoris. Es el homólogo del pene en la hembra, se encuentra situado en la fosa del clítoris, su función es la estimulación sexual (FCM, 2011). Está cubierto por los labios vulvares (Root 2012).

Vestíbulo. Es la porción que se extiende de la vulva a la vagina, en el piso del vestíbulo en su zona craneal se encuentra la uretra, además, en la región vagino-vestibular se encuentra el cíngulum, lugar en donde se abotona el bulbo del pene.

Vagina. Es larga de longitud variable, termina en su parte más profunda en un fondo de saco o fórnix (que debe llenarse de semen). Su función es la cópula (FCM, 2011).

Su pared presenta cuatro capas que desde adentro hacia fuera se denominan:

- Mucosa
- Submucosa
- Muscular
- Adventicia

La mucosa vaginal está recubierta por un epitelio escamoso estratificado, el cual varía su grosor en las distintas fases del ciclo estral de la perra.

La submucosa es una capa de espesor variable, también de tejido conectivo, en donde se localizan abundantes arteriolas y senos venosos.

La túnica muscular (músculo liso) presenta tres capas, de acuerdo a su distribución y la dirección de las fibras, separadas entre si por delgadas hojas de tejido conectivo.

La Adventicia: está formada por tejido conjuntivo y es rica en nervios y ganglios nerviosos (Stornelliet *al.*, 2006).

Cérvix. Es un orificio de material fibromuscular que separa al útero de la vagina, cuando las perras están en estro se encuentra abierto y permite la entrada de los espermatozoides. Durante la gestación se mantiene cerrado.

Útero. Es bicorneal de fusión baja, con un cuerpo corto y 2 cuernos largos dispuestos en forma de Y. Su función es el transporte de óvulos y espermatozoides, alojamiento y nidación de los cigotos, portador de la gestación; sostenido por el mesometrio.

Oviductos. Son estructuras tubulares que sirven de comunicación entre el ovario y el útero, están formados por tres porciones: 1) Infundíbulo (capta al óvulo cuando es liberado por el ovario), 2) Ámpula (en esta porción se realiza la fecundación) y 3) El Istmo (conecta al cuerno uterino con el oviducto). El oviducto esta sostenido por el mesosalpinx.

Ovarios. Se encuentran cubiertos por una bolsa ovárica, los ovarios están sostenidos por dos ligamentos (ligamento propio y el mesovario), su forma es elipsoidal. Sus funciones son la producción de óvulos y la secreción de hormonas (estrógenos y progesterona) (FCM, 2011).

2.2. Ciclo estral y endocrinología en la perra.

El ciclo estral de la perra es considerablemente más largo que en la mayoría de los otros animales domésticos (Chandra y Adler, 2008). La pubertad puede ser reconocida por la aparición del primer ciclo estral. Generalmente, esto ocurre algunos meses después de obtener su peso y estatura adulta, sin embargo esto es variable entre razas y cada una de las hembras (Caffarattiet *al.*, 2013). El ciclo estral consta de cuatro etapas que son el proestro, el estro, el diestro y el anestro (Root, 2001). Como su nombre lo afirma es un ciclo y ciclo se define como algo repetitivo el cual vuelve comienza al momento de terminar.

El ciclo estral en el perro es considerablemente más larga que en la mayoría de los demás animales domésticos. La fase folicular y ovulaciones espontáneas son seguidas por una fase lútea que tiene una duración media de aproximadamente 75 días y un anestro no estacional de 2-10 meses (Beijerink *et al.*, 2004).

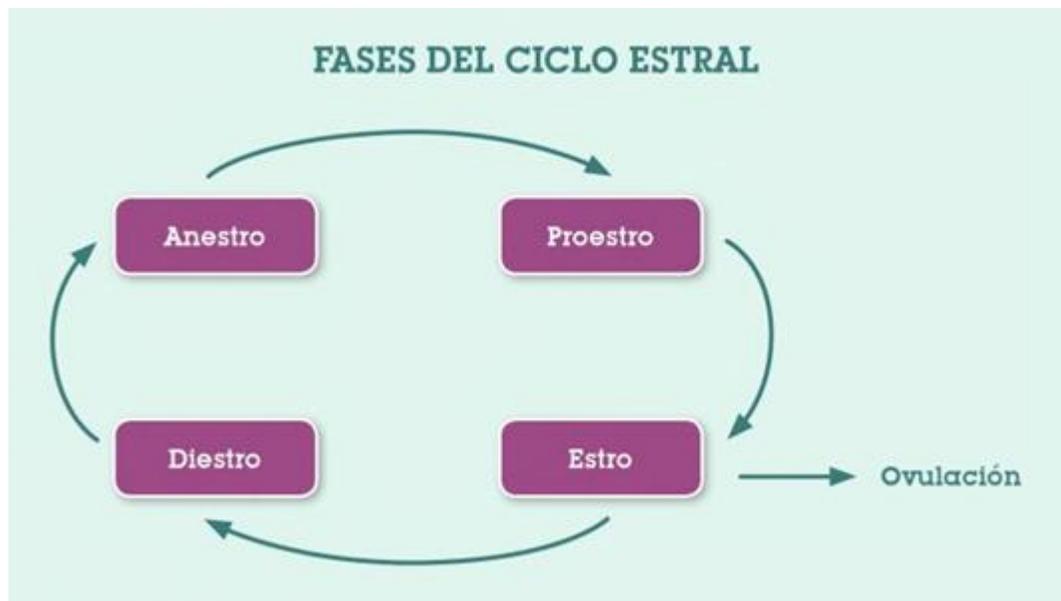


Figura 1. Fases del ciclo estral (Martí, 2011).

El ciclo estral está caracterizado por innumerables alteraciones, mediadas por hormonas, que inducen a modificaciones morfológicas, clínicas, citológicas y del tracto reproductivo, específicamente en la vagina. Factores estresantes como limitación en el ejercicio, peleas por territorio y períodos de celo, entre otros, asociados con las alteraciones hormonales ocurridas durante el ciclo, pueden determinar alteraciones de los mecanismos físicos, químicos o inmunológicos normales, que limitan la colonización microbiana de la piel y las mucosas (Cleffet *al.*, 2007).

Proestro. El proestro se inicia con el primer sangrado vaginal y se termina cuando la hembra acepta al macho. Durante toda la fase la hembra atrae al macho de manera pasiva, esto es por cuestión hormonal ya que aún no se encuentra receptiva (Martí, 2011). Durante el proestro, la perra no aceptará al macho para apareamiento y puede aún ser agresiva con él. A medida que se acerca el estro, se vuelve más receptiva, y las perras experimentadas sexualmente pueden permitir la monta del macho (Peirano, 2008).

Tiene una duración variable, en algunas perras puede durar 2-3 días y en otros 25 días, la duración media es de 9 días promedio y se define clínicamente como el momento en que comienza la descarga vulvar hemorrágica hasta la primera aceptación del macho (Tsutsui, 1989; Concannon, 2011).

Se caracteriza por una intensa actividad folicular ovárica que precede al estro. La perra se encuentra bajo la influencia de los estrógenos (Concannon, 1980), que se sintetizan y secretan en los folículos ováricos en desarrollo, desde el punto de vista hormonal en esta fase predominan los estrógenos en la perra (Concannon *et al.*, 1983). Los estrógenos son responsables de la secreción vaginal, atracción de los machos por acción de

las feromonas y preparación uterina para la gestación. El sangrado vulvar es un signo característico del proestro con una duración de 6 a 11 días (9 días promedio) (Caffarattiet *al.*, 2013). La vulva se encuentra aumentada de tamaño y con presencia de secreciones de origen uterino que pueden ser desde serosanguinolentas hasta hemorrágicas (Martí, 2011).

Los estrógenos alcanzan sus niveles máximos pasando de 2-10pg (durante el anestro) hasta llegar a finales de proestro a niveles entre 50-100 pg/ml. La progesterona se mantiene en valores basales < 1ng/ml hasta el final del proestro. La progesterona comienza a aumentar los niveles cuando se da el pico de LH (Martí, 2011). Durante el proestro, la perra se vuelve atractiva para los machos, pero sigue sin ser receptiva para la monta, aunque puede mostrarse más juguetona (Martí, 2009).

El proestro finaliza cuando la concentración de progesterona (P) sérica comienza a elevarse y la hembra permite el apareamiento (Feldman y Nelson, 2007).

Estro. El estro tiene una duración promedio de 9 días con un rango que oscila desde los 4 a los 24 días (Martí, 2011) y el comportamiento de la perra cambia de la agresividad a la pasividad (Concannon, 2011). La descarga vulvar sanguinolenta disminuye y se torna de un color más claro. La vagina se vuelve blanda y flácida para favorecer la penetración del macho. El estro finaliza cuando la hembra no acepta el apareamiento y el diestro tiene una duración promedio de 60 a 100 días. La vulva retoma su tamaño normal y ya no se observa agrandada o flácida (Wanke y Gobello, 2006; Feldman y Nelson, 2007).

La ovulación en la perra es espontánea, no inducida por el coito y se produce 24 a 72 horas después del pico de LH, siendo en la mayoría de los casos 48

horas después. La cantidad de ovocitos liberados es variable dependiendo de la raza, con rangos entre 5 y 15 por periodo ovulatorio (Mansillas, 2008).

La duración del pico de LH, según diferentes estudios, oscila entre 24 y 96 horas, dándose la ovulación durante los 2-3 días siguientes al pico de LH. Los niveles de progesterona comienzan su aumento aproximadamente al mismo tiempo que el pico de LH, a lo que llamamos aumento preovulatorio de la progesterona, el edema vulvar y vaginal disminuye por la baja de estrógenos. Los valores de progesterona durante el pico de LH están entre 0,8 y 3 ng/ml, en el momento de la ovulación entre 4,0 y 10 ng/ml y entre 4,0 y 20 ng/ml durante el periodo fértil (Martí, 2011).

Los signos clínicos muestran una vulva que permanece aumentada de tamaño pero este aumento es menos visible que en proestro. La descarga vaginal es de color marrón por disminución de la cantidad de sangre, aunque en algunos casos puede haber una descarga serosanguinolenta durante el proestro y estro (Peirano, 2008; Martí, 2011).

Durante el estro, la perra normal muestra un comportamiento receptivo o pasivo, permitiendo la monta. La cópula se da en fase de estro (Peirano, 2008).

La perra en estro busca activamente al macho (Lucas 2011). Puesto que la liberación de feromonas en este momento (estro) es máxima, no es raro observar perros, atraídos de calles a la redonda, esperando a la perra. (Peirano, 2008) Al momento del apareamiento adopta una posición definida, tensa los miembros posteriores, desvía y mantiene la cola sobre un lado y expone la vulva al arquear el lomo (Mansillas, 2008).

Este comportamiento se correlaciona con el descenso de los niveles de estrógeno y el aumento de los de progesterona (Martí, 2009). La luteinización de las células de la granulosa precede a la ovulación, y formación temprana del cuerpo luteal se observó a finales de estro (Chandra y Adler, 2008).

Diestro. El diestro es la etapa que se presenta después del estro y empieza el primer día en que la perra no acepta al macho, la duración es de 63 días en la perra gestante y de 100 días en perras no preñadas. Después de la ovulación, continúa el desarrollo del cuerpo lúteo dentro de las cavidades foliculares y por lo tanto, la concentración de progesterona sigue elevándose, alcanzando su pico 20 a 30 días postovulación o bien 2 a 3 semanas después del inicio del diestro y se mantiene en una concentración de 15 a 60 ng/ml aproximadamente por 1 ó 2 semanas (Esquivel, 2001).

Algunos de los signos clínicos pueden ser que la hembra rechaza la monta del macho, la hembra ya no atrae a los machos. La vulva regresa a su tamaño normal, desapareciendo la flacidez y la secreción en algunos casos puede aparecer una secreción densa y transparente (Martí, 2011).

La perra se relaja más a medida que progresa en el diestro. Puesto que la perra ovula mientras se encuentra en estro, (Peirano, 2008). En éste momento la concentración de progesterona en sangre se incrementa muy rápidamente pasando de valores de 1-2 ng/ml progresivos al pico de LH, a concentraciones de 15 a 90 ng/ml entre 15 y 30 días después del pico de LH. Después del día 30, las concentraciones de progesterona van reduciéndose gradualmente durante 5-6 semanas más (Martí, 2011).

Durante el diestro, la perra normal rechaza la monta y disminuye su atracción hacia los machos. La descarga vulvar disminuye y el edema vulvar va desapareciendo lentamente (Martí, 2009).

Anestro. Esta fase se caracteriza por involución del útero, la inactividad ovárica, y la reparación de los cambios y alteraciones que se han producido en el endometrio (Martí, 2011).

El comienzo del anestro en perras que no se preñaron, no es fácil de distinguir a diferencia de las hembras en gestación, donde el parto delimita la fase de diestro de la de anestro (Mansillas, 2008).

El anestro no estacional es de duración variable, de dos a diez meses (Chandra y Adler, 2008). Aproximadamente 4.5 meses este valor puede ser altamente variable ya que existe dificultad en la determinación del final del diestro y el principio del anestro. No existe diferencias clínicas entre una perra en diestro, anestro u ovariectomizada, la conducta es similar (Martí, 2011).

Durante el anestro se aprecian niveles moderados de FSH y LH, al final del anestro se producen secreciones de tipo pulsátil de GnRH hipotalámica que dan lugar a un aumento de FSH y LH provocando la creación de los folículos durante el proestro. Al final del anestro los estrógenos se encuentran en niveles basales (2-10 pg/ml) al igual que la progesterona (<1 ng/ml) (Martí, 2011).

Metaestro. El metaestro si bien no existe (Esquivel, 2012) algunos aun lo manejan como la fase posterior al estro y se caracteriza porque la perra deja de aceptar al macho. La palabra metaestro se utiliza tradicionalmente para describir la mayor parte de la fase luteínica de la perra; existen pocas razones lógicas para esto, y es más exacta la palabra diestro, ya que la fase de metaestro se ve ocultada por la fase del estro (Escobedo, 2008).

Existen impedimentos por lo cual la hembra puede no aceptar al macho, por causas que incapacitan la monta natural las cuales pueden ser:

- Hembras de carácter nervioso o con problemas de comportamiento (rehúsan monta o agresividad).
- Hembras dominantes con respecto al macho elegido y que no permiten la monta.
- Alteraciones anatómicas a nivel vulvo-vaginal que dificultan la penetración y le provocan dolor.
- Machos que presentan debilidad o alteraciones del tercio posterior y/o columna.
- Machos de comportamiento sumiso, libido disminuida o con alteraciones de la erección.
- Incompatibilidad entre el tamaño de la hembra y el del macho (Root, 2001; Lucas, 2011).

La influencia de la nutrición en el ciclo estral es más visible en la pubertad y el restablecimiento del ciclo estral después del parto. Los animales que ingieren mayores nutrientes alcanzan la pubertad a una edad más temprana que los animales privados de nutrientes (Reece, 2009).

2.3. Hormonas y fisiología reproductiva de la perra.

Los ovocitos de la hembra se ovulan en un estado inmaduro, como ovocitos primarios, y no pueden ser fertilizados de inmediato. La fertilización ocurre solamente después de la maduración del ovocito primario, la extrusión de su primer cuerpo polar y la finalización de la primera división meiótica para formar el ovocito secundario. Mientras que estos eventos de maduración se llevan a cabo antes de la ovulación en la mayoría de otras especies, que no se han completado por lo menos hasta 48 horas después de la ovulación en

el perro. La ovulación es causada por un aumento de la LH (hormona luteinizante) y las concentraciones de plasma. En los perros, la ovulación se produce dos días después del pico de LH, y los oocitos permanecen viables en el tracto reproductivo durante otros cuatro o cinco días antes de comenzar a someterse a la degeneración. Los períodos de comportamiento de proestro y de estro se definen basándose en la aceptación del macho, y siguen una sobre la otra. La transición del proestro al estro en comportamiento puede ser rápida o lenta, y puede ocurrir poco antes de o simultáneamente con el pico pre-ovulatorio de LH o incluso algunos días después (England y Concannon, 2002).

Estrógenos. El aumento de estrógenos causa una mayor velocidad de la renovación de las células epiteliales de la vagina, resulta la cornificación progresiva observada en la citología vaginal y el engrosamiento de la pared vaginal para prepararse a la monta. También se observa un edema progresivo de la mucosa vaginal que puede verse en la exploración endoscópica.

El nivel máximo de estrógeno es variable en las perras y los cambios relativos no están correlacionados con la ovulación ni el periodo fértil. Los niveles de estrógenos se valoran mejor mediante citologías vaginales y endoscopias seriadas. Los niveles de estrógeno no indican el periodo fértil porque la ovulación está provocada por la subida de LH, no por un pico de estrógeno. El examen de las células de la superficie del epitelio vaginal nos dará información de la fase del ciclo estral. Es importante usar una técnica adecuada para que las células obtenidas sean representativas de los cambios hormonales que suceden. Deben obtenerse las muestras en la vagina craneal porque las células de la fosa clitoridiana, vestíbulo y/o vagina caudal no son tan indicativas de la fase del ciclo. El número de capas que forma el epitelio vaginal aumenta de forma espectacular por la influencia del

aumento de los niveles de estrógeno, presumiblemente para proveer protección a la mucosa durante la cópula. Así, a medida que sube el estrógeno durante el proestro, aumenta la velocidad de maduración de las células epiteliales, igual que el número de células queratinizadas y cornificadas observadas en el frotis vaginal. La cornificación completa permanece todo el estro hasta que ocurre el cambio del diestro 7 a 10 días después de la subida de LH, lo que marca el final del diestro. El frotis vaginal cambia repentinamente desde la cornificación completa aun 40-60% de células inmaduras (parabasales e intermedias) en un periodo de 24 a 36 horas. Si se realizan frotis vaginales hasta observar el cambio del diestro, puede calcularse retrospectivamente la subida de LH, la ovulación y el periodo fértil (Martí, 2009).

Hormona Luteinizante (LH). En caninos, hay un pico de concentración de LH aproximadamente 2 días antes de la ovulación y los ovocitos se ovulados 1-2 días más tarde. Los ovocitos de la mayoría de las especies de mamíferos son ovulados en la II etapa de la metafase de la meiosis; sin embargo, los ovocitos caninos se ovulan en estadio de vesícula germinal y maduran hasta metafase II en el oviducto (Willingham *et al.*, 2003).

Al final de la fase folicular del ciclo estral, se produce un aumento notable de la LH por encima de su nivel basal en unas 24-48 horas, seguido por un retorno a los niveles basales. Se cree que esta subida de LH tiene lugar en respuesta al descenso de la relación estrógeno: progesterona cuando los niveles de estrógeno disminuyen y los de progesterona suben. La subida de LH desencadena la ovulación, siendo así el suceso endocrinológico central del ciclo reproductivo de la perra, con el resto de eventos siguientes parecidos entre perras. En consecuencia, la medición diaria seriada de LH para identificar la fecha exacta de la subida de LH es la herramienta

diagnóstica más precisa para determinar el momento de la monta (Martí, 2009).

Pico preovulatorio de LH. El incremento de LH produce un rápido crecimiento, maduración y luteinización de folículos dándose la ovulación (36 a 50 horas después) además de producir un cambio en las células productoras de estrógenos (folículos de 3 a 4 mm) en células productoras de progesterona (cuerpo lúteo de 8 a 9 mm). Este fenómeno marca la transición de la fase folicular a la fase lútea y tiene una duración de 1 a 3 días.

En la mayoría de los ciclos el pico de LH se presenta en el día que cambia de proestro a estro sin embargo, en algunos ciclos el principio del estro y la primera cópula pueden ocurrir de 2 a 3 días de la elevación de LH e incluso hasta 4 a 5 días antes (4) situación que no garantiza una gestación cuando la perra ha recibido una sola monta por lo que es muy importante programar el número suficiente de cruza para garantizar el éxito de las mismas (Villaseñor, 2007; Esquivel, 2012).

Medición de niveles séricos de LH. La hormona luteinizante es una hormona proteica que se puede medir en sangre. Al llegar a su pico preovulatorio provocara la ovulación. En algunas de las hembras la duración del pico es muy corto y no se puede detectar con las mediciones diarias. La ovulación ocurre de 48 a 72 horas después del pico de LH. Esta herramienta nos puede indicar el momento de la ovulación, la desventaja que se tiene al medir esta hormona es que el pico de LH dura muy poco tiempo (generalmente 24 horas) por lo tanto, la muestra de sangre se debe tomar cada 24 horas. Esta Herramienta es la menos usada y cuando se realiza se recomienda acompañarla midiendo los niveles séricos de progesterona. Se ha descrito que la duración de la gestación desde el pico de LH es de 64-66 días (promedio 65) (Lacroix, 2004; FCM, 2011).

Paquete diagnóstico de LH. El paquete puede no ser exacto si se usa después de la fecha de vencimiento, o si el paquete de aluminio que contiene el dispositivo de ensayo y la pipeta se abre mucho antes de que la prueba se vaya a ejecutar. Para la toma de muestra se necesita suero sanguíneo. La muestra no debe ser lipémicas o hemolizadas. La prueba se debe ejecutar el mismo día en que se recogió el suero. Si eso no es posible, el suero debe ser refrigerado, no congelado, hasta que se pueda ejecutar la prueba (Root, 2001).

Progesterona. La producción de progesterona aumentos notablemente antes de la ovulación en perras a concentraciones detectables en los sueros periféricos en el día antes de el pico de LH (Root, 2001; Willingham *et al.*, 2003).

La elevación de la progesterona actúa de forma sinérgica con la disminución del estrógeno para reducir el edema vulvar y vaginal, lo que puede apreciarse mediante vaginoscopia. El resto de signos clínicos es poco apreciable. Pueden usarse mediciones seriadas en sangre cada 2 días para identificar la subida inicial de progesterona, lo que indica que ya ha habido la subida de LH (Martí, 2009).

Durante la fase lútea del ciclo estral, la progesterona alcanza altos niveles en sangre, pudiendo desencadenar piómetra (una complicación infecciosa), esto dependerá del útero de la hembra y puede afectar su potencial reproductivo e incluso conducirla a la muerte. Este complejo presenta una alta prevalencia y se observa frecuentemente en hembras de edad media y viejas, o en hembras jóvenes que han recibido tratamientos hormonales (Silva y Loaiza, 2007).

Medición de niveles séricos de P4. La medición de la concentración de progesterona puede utilizarse como un indicador indirecto del pico de LH, cuando los niveles de progesterona se encuentran en una concentración de 2ng/ml, se considera que ya se dio el pico de LH. Se utiliza un método cuantitativo (radioinmunoensayo) para medir los niveles de progesterona en sangre y determinar el día de la ovulación. La ovulación se dará cuando los niveles de progesterona se encuentren en 7ng/ml (4 a 10ng/ml) (Lacroix, 2004).

La progesterona puede medirse mediante RIA o quimioluminiscencia en casi todos los laboratorios. Existen varios paquetes comerciales de diagnóstico semicuantitativo. La progesterona varía durante la subida de LH de entre 0,8 y 3,0 ng/ml, entre 1,0 y 8,0 ng/ml en la ovulación, y entre 4,0 y >20,0 ng/ml durante el periodo fértil. No obstante, si se obtienen mediciones seriadas, puede estimarse la subida de LH el día en que hay una subida clara del nivel de progesterona. Aunque no es tan preciso como la medición real de la subida de LH con una prueba de LH, la estimación a través de los resultados de la progesterona no deja de ser muy útil y, a menudo, es un método más disponible y cómodo (Martí, 2009).

En la perra, la progresión desde la primera hasta finales de anestro se caracteriza por aumento de la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) por el hipotálamo. También hay una mayor expresión hipotalámica de los genes que codifican para el receptor de estrógeno y la aromatasa P450 que cataliza la biosíntesis de estrógenos. Durante el curso de anestro, hay un aumento en la sensibilidad de la pituitaria a la GnRH y en la capacidad de respuesta ovárica a las gonadotropinas. Un aumento en la hormona estimulante del folículo (FSH) de la concentración plasmática basal y el aumento de la hormona luteinizante (LH) de pulsatilidad poco antes de la aparición de la pro-estro parecen ser determinantes importantes de la puesta

en marcha de una nueva fase folicular que lleva a la ovulación en la perra (Beijerink, 2004).

El día óptimo para la monta natural, inseminación artificial (IA) con semen fresco, refrigerado y congelado, es dos días después de la ovulación. La tasa de gestación se incrementa en todas las técnicas, si la hembra es servida más de una vez en el periodo fértil (Lacroix, 2004).

Las concentraciones de progesterona sérica siguen aumentando después de la ovulación, durante el tiempo en que los ovocitos completan la maduración en el oviducto (Willingham *et al.*, 2003).

Andrógenos. Los andrógenos juegan un papel esencial como autocrina o paracrina agentes de ovario folicular en el crecimiento, maduración y luteinización. Este papel se ilustra por el hecho de que hembras hiperandrogénicas tienen más folículos en desarrollo que las hembras de ciclos normales, debido a los efectos tróficos de los andrógenos. Actividad de los andrógenos es la suma de un efecto directo mediado por los receptores de andrógenos y un efecto indirecto de los estrógenos producidos por la aromatización de los andrógenos. Ambas hormonas son esenciales para la maduración de folículos ováricos y fertilidad normal (Vermeirsch *et al.*, 2001).

Formación del cuerpo lúteo. Esta formación se inicia con cambios morfológicos y bioquímicos de las células de la teca interna y de las células de la granulosa del folículo preovulatorio. En la perra, estos cambios suelen presentarse al final del proestro, básicamente el cuerpo lúteo deriva de estas dos células productoras de esteroides foliculares (teca y granulosa) las células se transforman en 2 distintos tipos celulares chicas y grandes respectivamente. Las células chicas son células de la teca interna

luteinizada, se les conoce como células tipo I o células I por otro lado, las células grandes son las células de la granulosa luteinizada y se les conoce como células tipo II (Villaseñor, 2007).

La producción de progesterona (80%) es por parte de las células grandes del cuerpo lúteo ellas, contienen poca cantidad de receptores para LH en comparación con las células chicas las contienen la mayoría de los receptores para LH. Así mismo las grandes contienen la mayoría de receptores para PgF2 alfa (Root, 2001). Diversos estudios realizados en ovejas, han informado que la relación entre células grandes y células chicas es el factor más importante para entender la regulación en la secreción de progesterona y la destrucción del cuerpo lúteo de la perra no se han realizado estudios que permitan comprender estos fenómenos aunque se sabe que en los carnívoros el cuerpo lúteo presenta diferencias en el tamaño celular (Esquivel, 2012).

Maduración de ovocitos y fertilización. La perra ovula en un estado de inmadurez conocido como ovocito primario de la manera que la segunda meiosis concluye después de la ovulación en el segmento distal del oviducto. En estudios in vitro se ha visto que el espermatozoide del perro es capaz de penetrar ovocitos inmaduros y formar el pronúcleo masculino, sin embargo, el término fertilización se refiere a la fusión del pronúcleo femenino con el masculino situación que se presenta hasta la maduración del ovocito no ha sido determinado aún sin embargo algunos estudios sugieren que este fenómeno puede ocurrir desde 2 hasta 6 días después de la ovulación.

La recomendación es detectar oportunamente el período fértil, programar el número adecuado de montas y empezar a contar la gestación a partir de la última monta 63 a 66 días. El espermatozoide puede permanecer fértil en el aparato reproductor femenino por 6 a 7 días (Esquivel, 2012).

Supresión del ciclo estral. El ciclo estral se puede suprimir usando progestinas como fármacos anti-fertilidad en perros y gatos, el tiempo y la duración del tratamiento puede variar. La eficacia resultante puede referirse a las siguientes: a) Supresión aguda del ciclo actual, b) Supresión temporal de un ciclo eminente o c) Supresión de los ciclos. En la perra, una progestina puede ser administrada oralmente en proestro temprano a dosis moderadas a altas, como un medio para suprimir el proestro actual, previene el estro, causa una fase lútea artificial prematura y resulta en una supresión del próximo ciclo por varias semanas a varios meses. La administración oral durante el anestro, a dosis bajas por varias semanas (o una inyección de una formulación de acción corta), puede producir una fase lútea artificial que pospone la ocurrencia del nuevo ciclo por unos pocos meses a varios meses. La administración continua de una progestina comenzando en anestro, puede retrasar el inicio del próximo ciclo por varios meses, usando tanto administraciones repetidas por vía oral, inyecciones repetidas de formulaciones de corta acción, o una o más inyecciones de formulaciones de larga acción (Romagnoli y Concannon, 2003).

El período de fertilización. Es el momento en el que los ovocitos viables de la perra están disponibles en las trompas uterinas y son lo suficientemente maduro como ovocitos secundarios para ser fertilizados por los espermatozoides. En circunstancias normales en la mayoría de las perras que se extiende a partir de cuatro días después del pico preovulatorio de LH hasta algunos siete días después del pico de LH (es decir, a partir de dos días después de la ovulación hasta cinco días después de la ovulación). En el caso extremo, que se puede extender a los días 8 o 9 (e incluso hasta el día 10) después del pico de LH, aunque esto con una menor fertilidad. La fertilidad generalmente disminuye muy rápidamente a partir de 7 días después del pico de LH, los ovocitos sufren degeneración y el cuello del

útero se cierra durante un período de 1 a 2 días. La terminación del período de fertilización puede ser debida principalmente a la degeneración de los ovocitos o para el cierre del cuello uterino y la prevención de espermatozoides de entrar en el tracto reproductivo en número suficiente (England y Concannon, 2002).

El período fértil. Es el tiempo durante el cual de un apareamiento o inseminación puede resultar un embarazo. Este período incluye no sólo el período de fertilización, sino también los pocos días anteriores, debido al hecho de que el espermatozoides fértil del perro puede permanecer durante varios días en el tracto reproductivo de la hembra. Los espermatozoides pueden sobrevivir en el tracto de hasta 5 o 6 días antes de la ovulación y la oportunidad de penetrar en un ovocito singular recientemente ovulado, y luego formar un pronúcleo masculino viable y dar lugar a la fecundación de 7 u 8 días después de la deposición del semen. El período fértil puede ser considerada para extenderse desde tres días antes del pico de LH hasta 7 días después del pico de LH preovulatoria, y puede ser aún más largo al utilizar sementales de calidad o perras en la que los ovocitos pueden sobrevivir un día más o dos más allá de la norma (England y Concannon, 2002).

2.4. Ciclo ovárico.

El ciclo ovárico de perras se controla normalmente por el evaluación de los cambios característicos de la mucosa vaginal y el epitelio vaginal, y el análisis de endocrina parámetros (Köster y Günzel, 2001).

La raza tiene un importante efecto sobre el momento del primer estro en la perra. Por lo general las perras muestran su primer ciclo ovárico después de que alcanzan la talla y peso corporal de adulto. Sin embargo, hay variaciones

considerables dentro de la misma raza, así como entre las diferentes razas. En los Beagle, por ejemplo, el primer proestro suele ocurrir entre los siete y 10 meses de edad. Incluso en un ambiente de laboratorio controlado, el primer proestro puede ocurrir de los seis a los 13 meses de edad (Concannon *et al.*, 1983).

Es posible que las perras dominantes nunca exhiban celo, y las perras sumisas pueden permitir las montas por el macho incluso cuando no están en estro (Root, 2001).

El celo silencioso tan solo es aquel que pasa inadvertido para el propietario debido a que el estro en perra joven puede relacionarse con tumefacción vulvar, hemorragia, atracción de machos o cambios de la conducta pocos notorios. La experiencia del propietario, la longitud del pelo de la perra (la hemorragia vulvar es más fácil de observar en una de pelo corto), la limpieza del animal (una que se lame mucho tiene más probabilidades de ocultar la hemorragia) y la presencia de un perro macho en el hogar son solo algunas de las variables que determinan la facilidad con la que un propietario puede notar el estro (Concannon, 1980).

Características del ciclo ovárico. Por lo general se cree que las perras experimentan ciclos ováricos dos veces al año, durante la primavera y de nuevo en el otoño. Sin embargo, las perras en realidad experimentan ciclos ováricos durante todo el año. Las estaciones de reproducción dependen de factores tanto genéticos como de manejo. La preferencia de reproducirse al final del invierno, y principios de la primavera, tal vez se derive de una ventaja vinculada con la evolución al parir camadas en un periodo en que el aporte de alimentos comienza a aumentar en relación con mejores condiciones climáticas. Los patrones estacionales de ciclos ováricos de la perra deben distinguirse de las preferencias del propietario. Las perras

experimentan actividad del ciclo ovárico, se reproducen y paren en todos los meses del año, pero este proceso tiende a ser más frecuentes a finales invierno y principio de la primavera además de los meses de otoño (Feldman y Nelson, 2000).

Factores que afectan el ciclo ovárico. Existen diversos factores que afectan el ciclo ovárico, entre ellos enfermedades que comprometen la endocrinología, fisiología o anatomía de la reproducción de la hembra; entre los más comunes encontramos los siguientes:

Quistes foliculares. Son consecuencia de una deficiencia en la absorción del líquido en un folículo de desarrollo incompleto. Pueden ser pequeños (<1 cm) o grandes con un diámetro >10 cm. Los quistes funcionales pueden producir estrógenos.

Piometra. Es una patología que clínicamente se produce en diestro o muy próxima a este con valores de progesterona por encima de 1 ng/ml, aunque en algunos casos se detecta a principio del anestro, se cree que su inicio es siempre en diestro o fase dominada por la progesterona. Puede haber salida del fluido purulento por el cérvix, en cuyo caso hablamos de piometras abiertas o de cérvix abierto o puede no haber salida de pus por varias causas y no solo por que el cérvix esté cerrado sino también por presencia de tumores en la luz uterina o por adherencias de las paredes de los cuernos que impiden el paso del pus. Es común ver definida la piometra como el complejo endometritis-hiperplasia quística endometrial-piometra, ya que tradicionalmente se ha pensado que la endometritis subaguda da lugar a una hiperplasia endometrial quística y a su vez las hembras que la padecen tiene una mayor predisposición a desarrollar la piometra. Es una patología que afecta al 25% de las perras adultas no castradas antes de los 10 años. En gatas se asocia con nulíparas con mas de 5 años de edad, hay casos

descritos en hembras prepúberes y en hembras gestantes. Las hembras con anomalías en la vagina y en el vestíbulo vaginal como septos o bridas pueden presentar una mayor predisposición a padecer piometra. Aunque estadísticamente un tercio de las hembras son diagnosticadas en anestro no se puede confirmar si fueron diagnosticadas después de la fase luteal por un diagnóstico tardío o por un acortamiento prematuro del diestro debido a la producción de prostaglandinas por la inflamación uterina (Martí, 2013).

Anomalías congénitas.

- a) restos de la membrana del himen
- b) aplasia e hipoplasia segmentaria
- c) doble vagina
- d) vagina en fondo de saco (Padrón, 1990).

2.5. Citología vaginal exfoliativa.

Es un método simple para el seguimiento de la fase del ciclo estral. Las células vaginales pueden recogerse utilizando un hisopo de algodón humedecido con solución salina o por aspiración de la cavidad vaginal usando un catéter de plástico, antes se limpia suavemente sobre la superficie de la mucosa vaginal. Cuando se utiliza el primer método es importante no permitir el contacto del hisopo con el vestíbulo, ya que la recolección de estas células puede dar variable o resultados erróneos. Los hisopos deben introducir y eliminar con un pequeño espéculo o guardia. Una vez recogidas las células se colocan en un portaobjetos de vidrio ligeramente girar la torunda de algodón, o mediante la aplicación del fluido aspirado que luego se extendió en una película delgada sobre la laminilla (De Buen, 2001).

El frotis puede teñirse utilizando un sencillo tinción Wright-Giemsa modificada (de HarlecoDifQuik, EM Science, Gibbstown, NJ, EE.UU.; Merck, Darmstadt, Europa) o con tinción tricrómica. La tinción de Wright modificada es fácilmente disponible y tiene la ventaja de que la preparación de la muestras tarda menos de un minuto. La tinción tricrómica tiene la ventaja de identificar las células queratinizadas basado en un índice eosinofílico, pero la técnica de tinción es laboriosa (England y Concannon, 2002).

La citología vaginal exfoliativa se basa en determinar el tipo y cantidad de células de las diferentes etapas del ciclo estral, siendo esto posible por los cambios hormonales que sufre la vagina durante el ciclo, se reflejan en la morfología de sus células epiteliales. Al inicio del ciclo, la célula epitelial está en contacto con la irrigación sanguínea (nutrición celular). Conforme los niveles de estrógenos se incrementan el epitelio vaginal, se va engrosando ocasionando que la célula epitelial se vaya separando del aporte sanguíneo dando como resultado una transformación celular que va de célula parabasal a célula anucleada o escama (Esquivel, 2012).

Clasificación de las células vaginales. Las células vaginales que se estudian corresponden a un epitelio escamoso estratificado que descansa en una membrana basa de donde germinan sus células a partir de una célula madre. Las células basales y parabasales son células grandes de forma redonda u oval con un núcleo visible y grande con una pequeña cantidad de citoplasma. Las células intermedias son grandes con bordes irregulares y tienen núcleo más pequeño que las basales y parabasales y con mayor cantidad de citoplasma. Las células superficiales Son células con núcleo pequeño, picnótico, abundante citoplasma, de bordes angulosos. Las células anulares, también conocidas como escamosas, son células más pequeñas, sin núcleo, de bordes angulosos e irregulares (Esquivel, 2012).

Evaluaciones clínicas. El uso exitoso de las evaluaciones clínicas en el manejo de la cría requiere una apreciación de la transición normal de proestro al estro, y los cambios normales en el comportamiento sexual, existen opiniones mal informadas acerca del día en que se encuentra el ciclo en manos de muchos propietarios de perros y criadores. También se necesita la comprensión y ayuda de las técnicas disponibles - citología vaginal, grado de tumescencia vulvar, los exámenes vaginoscopía, e incluso de la medición de progesterona sérica y LH, para estimar el día de la ovulación y el período posterior en el que puede ocurrir la fertilización (England y Concannon, 2002).

La determinación precisa del momento de la ovulación permite el óptimo manejo reproductivo en las perras. La correlación entre los cambios físicos y de comportamiento durante el estro y el tiempo de ovulación es pobre. Determinar el día de ovulación en la perra permite programar un único apareamiento o una sola maniobra de inseminación artificial, dando por resultado una óptima tasa de concepción y tamaño de camada. Además, el día de la ovulación es una referencia más segura para la determinación del día del parto, en comparación con los días de conducta receptora o del apareamiento (Lacroix, 2004; Esquivel, 2012).

Muchos criadores se basan en contar el número de días desde el inicio del proestro, y creen que las perras ovulan siempre un número definido de días desde el inicio de este evento. Este no es el caso, para cualquier raza. La duración del proestro es variable entre perras. Mientras que la "perra media" puede ovular 12 días después del inicio del proestro (y por lo tanto debe ser acoplado en el día 14 y 16), algunas perras ovulan ya en el día 5, y otras tan tarde como 30 días después del inicio del proestro. Por lo tanto, el apareamiento en el día 12 y el 14, que es la práctica de cultivo común, a menudo no da lugar a la concepción. El término "calor" no es particularmente

útil, pero se utiliza comúnmente para referirse a los períodos combinados de proestro y estro. El "día 0" fisiológico y endocrinológico del ciclo es el día del pico de LH, el evento que desencadena la ovulación de los folículos ováricos 2 días más tarde. Se puede o no coincidir estrechamente con una transición distinta de proestro al comportamiento del estro (England y Concannon, 2002).

Existen paquetes disponibles para la valoración semicuantitativa de la LH sérica en la clínica que identifican la subida previa a la ovulación y, de este modo, el momento de ovulación y el periodo fértil. Esta prueba es el sistema más preciso de calcular el momento de la ovulación y, por ello, debería ser considerada como "patrón". Deben obtenerse muestras a diario, a la misma hora, para medir la LH porque la subida puede durar tan solo 24 horas en muchas perras y podría pasar desapercibida si nos saltamos un día. Los paquetes comerciales pueden estar sujetos a la interpretación variable de quien los realiza, por lo que debería realizar la prueba la misma persona siempre que sea posible (Martí, 2009).

La medición de la concentración plasmática de LH periférica es un método fiable y preciso para determinar el momento óptimo para aparearse. En la mayoría de los países no existe un ensayo comercial disponible para LH en suero canino, Una de las preocupaciones es que debe ser usado diariamente para detectar el día del pico de LH (England y Concannon, 2002).

Procedimiento para la toma de muestras. Se introduce el hisopo (seco o con solución salina) en el punto más dorsal de la hendidura vulvar y orientándolo hacia arriba en un Angulo de 45° haciéndolo girar, para avanzar más allá de la papila uretral sin lastimar a la perra (Figura 1). Se hace rodar el hisopo con la superficie vaginal y retirar en un movimiento. Después se rueda sobre una

laminilla de vidrio limpia, varias veces y cuidadosamente enseguida se aplica la tinción deseada (Figura 2) (Root 2012).

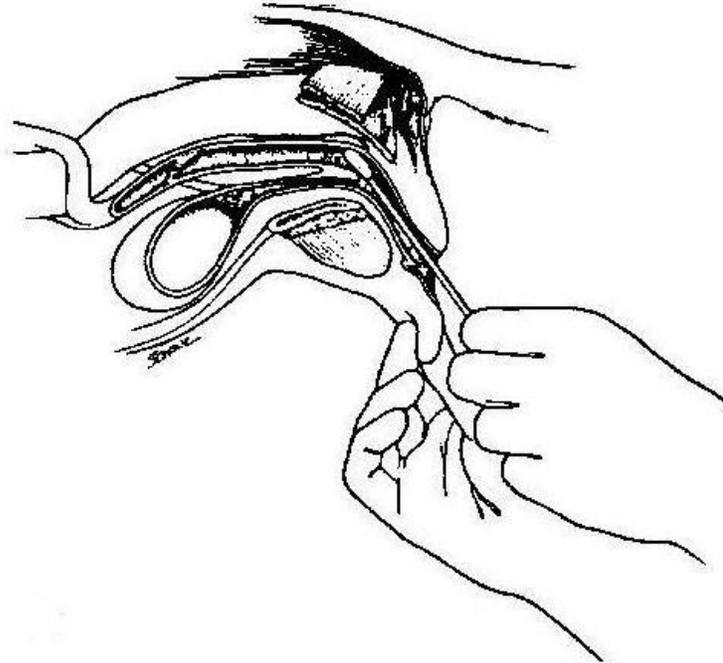


Figura 2. Toma de muestra para la citología vaginal.

Hay características del tracto reproductivo de la perra las cuales son particularmente importantes para realizar la citología vaginal correctamente. La posición del orificio uretral debe ser reconocida para evitarlo a la hora de introducir el hisopo (Figura 1).

La citología vaginal es una técnica utilizada para determinar en qué etapa del ciclo estral se encuentra la hembra en ese momento (Esquivel, 2012).

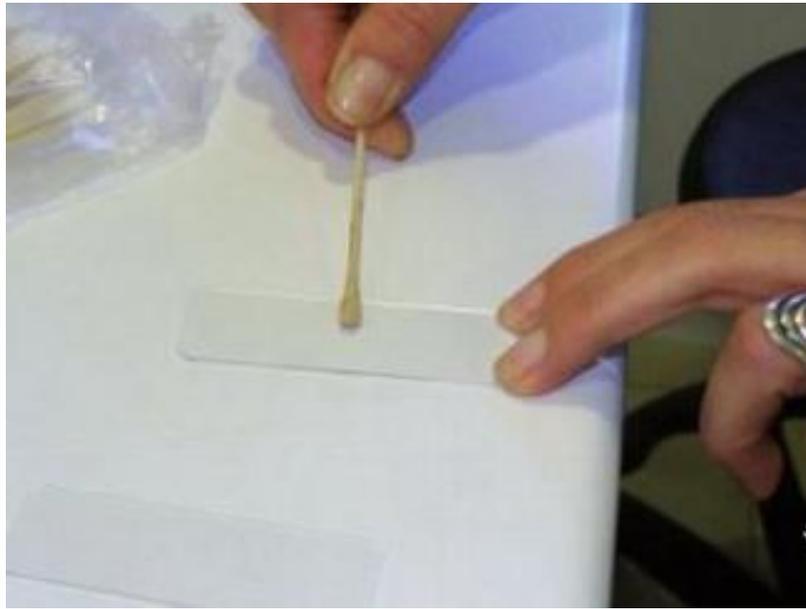


Figura 3. Impresión de las células en un portaobjetos.

Proestro. Se caracteriza por la presencia de muchos eritrocitos y de distintas células epiteliales que varían a lo largo del proestro. El porcentaje de células parabasales e intermedias disminuye por que el número de células superficiales y escamosas aumentan (Martí, 2011).

Estro. Se caracteriza por la presencia de células superficiales y escamosas anucleadas. Las escamas varían entre el 80% y el 100% no deben observarse neutrofilos y puede haber presencia o ausencia de eritrocitos (Martí, 2011). La cornificación completa generalmente ocurre antes del pico de LH (Root, 2001).

Diestro. Varía según se encuentre al principio o al final del diestro. El primer día de diestro se puede definir como el día en que citológicamente el número de células superficiales disminuye un 20%.

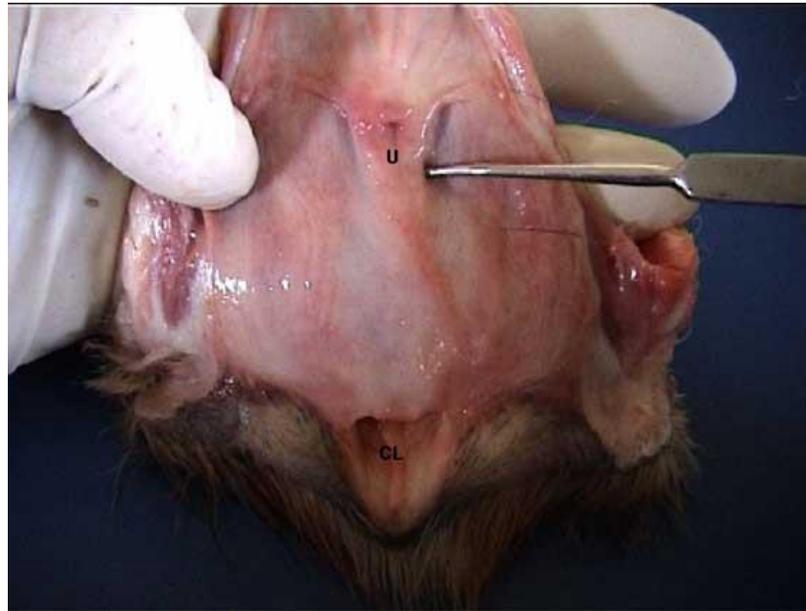


Figura 4. Superficie ventral del vestíbulo vaginal. Puntos importantes en ésta área son la fosa del clítoris (CL) y el orificio uretral o meato urinario (U) (Wilson 2003).

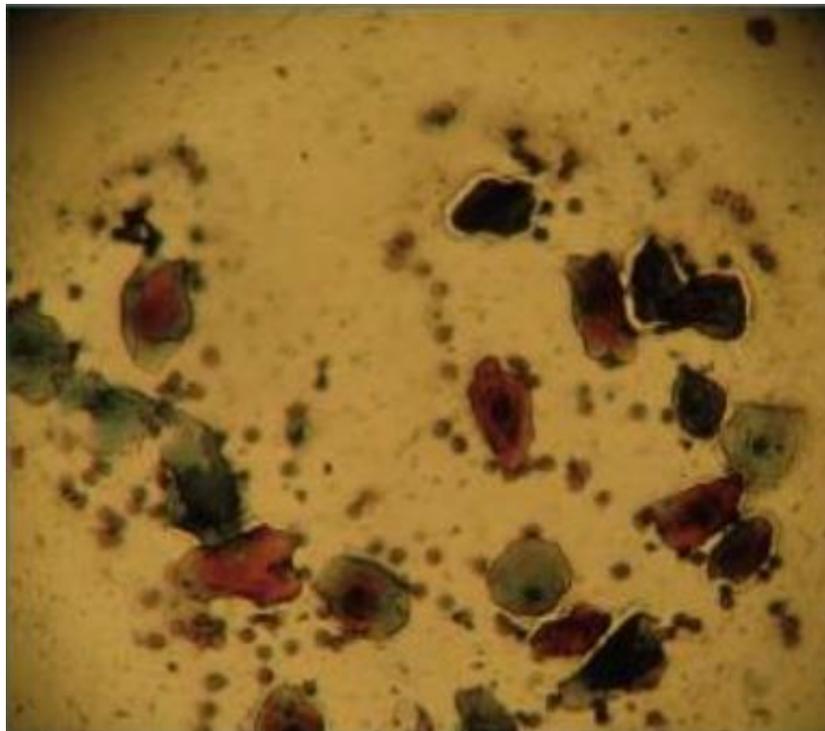


Figura 5. Citología vaginal al inicio del proestro (Edens y Health, 2005).

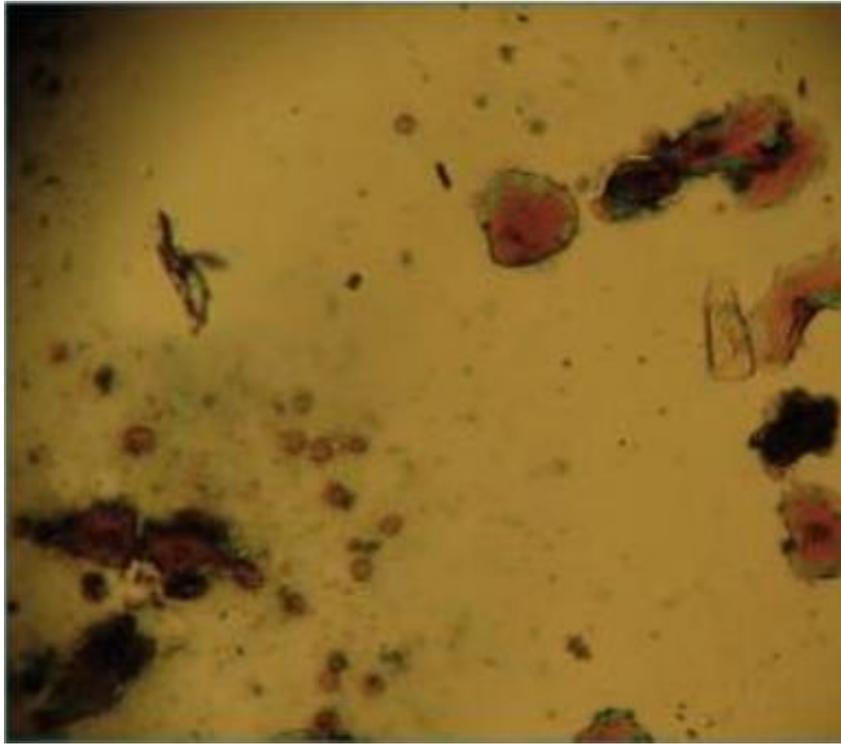


Figura 6. Citología vaginal con proestro intermedio (Edens y Health, 2005).

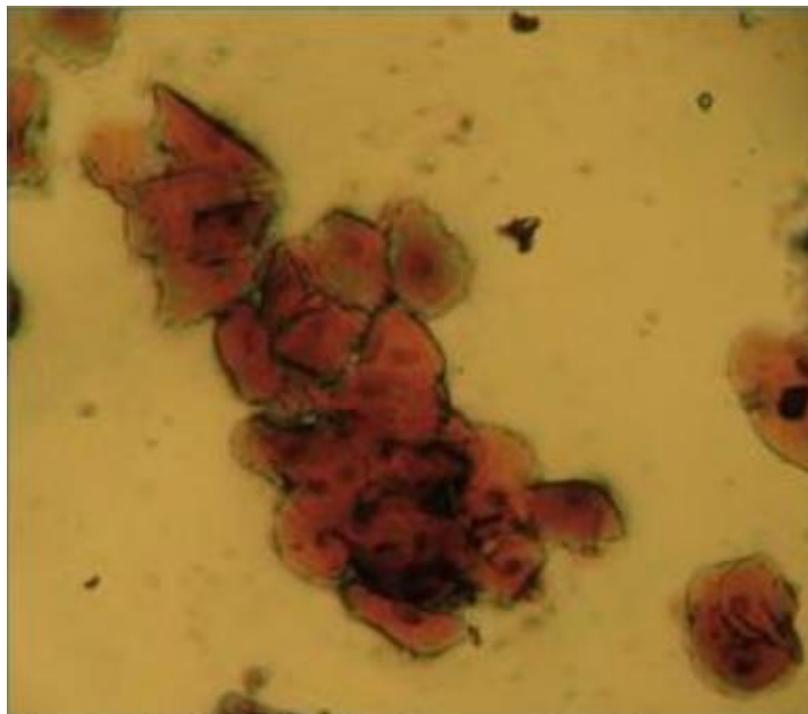


Figura 7. Citología vaginal al final del proestro (Edens y Health, 2005).

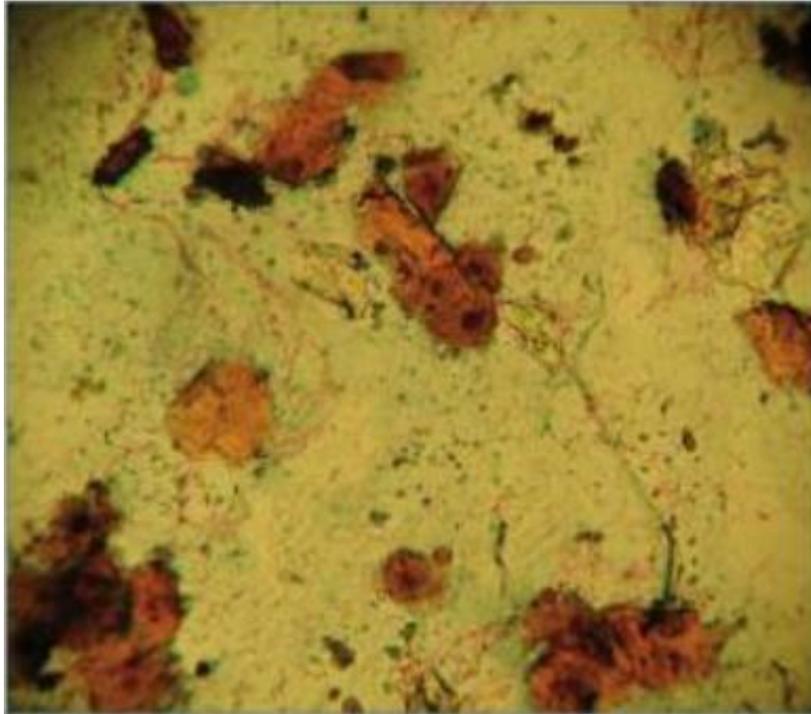


Figura 8. Citología vaginal al principio de estrus (Edens y Health, 2005).

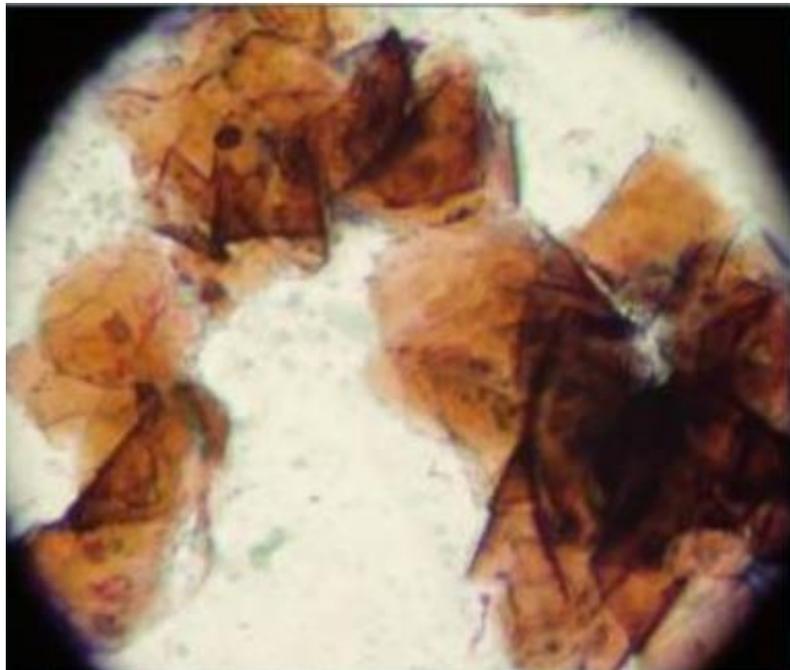


Figura 9. Citología vaginal con estrus intermedio (Edens y Health, 2005).

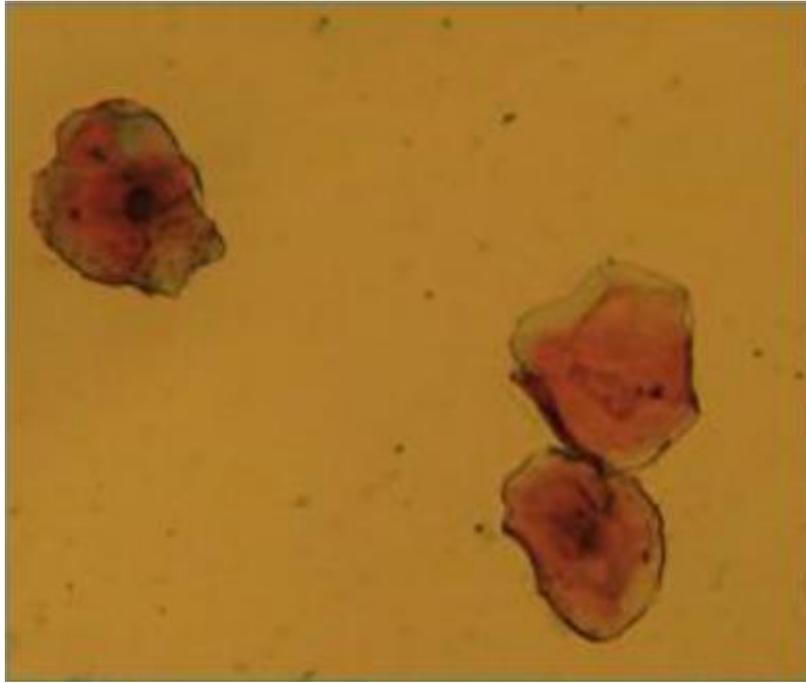


Figura 10. Citología vaginal al final del estro (Edens y Health, 2005).

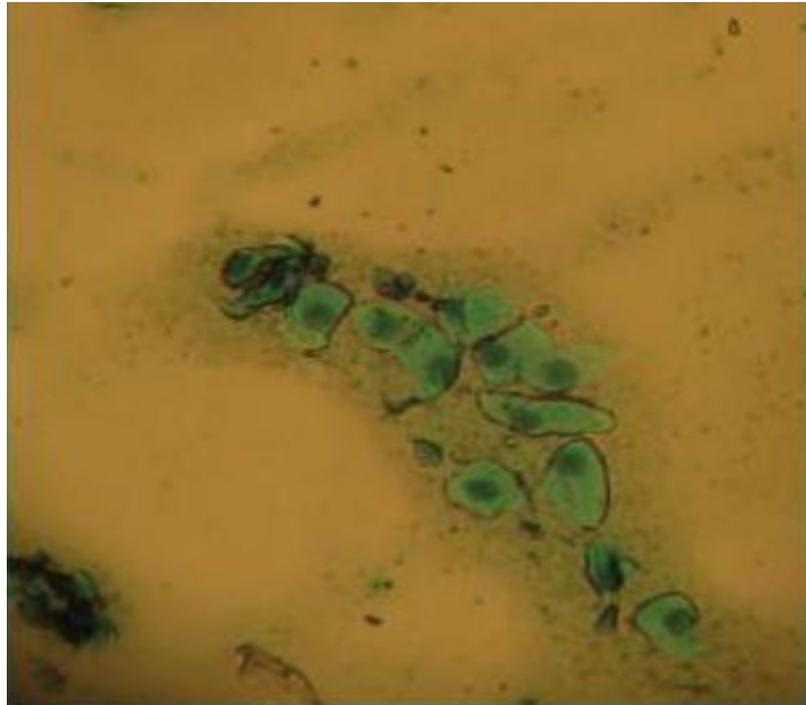


Figura 11. Citología vaginal con diestro intermedio (Edens y Health, 2005).

En los primeros días del diestro se va a encontrar un fondo limpio con un 80% de células superficiales; en algunas perras se observará presencia de neutrófilos, el frotis se parecerá al del anestro después de los primeros días, reaparecerán nuevamente las células parabasales y las células intermedias, en este momento ya no se encontrarán eritrocitos (Martí, 2011).

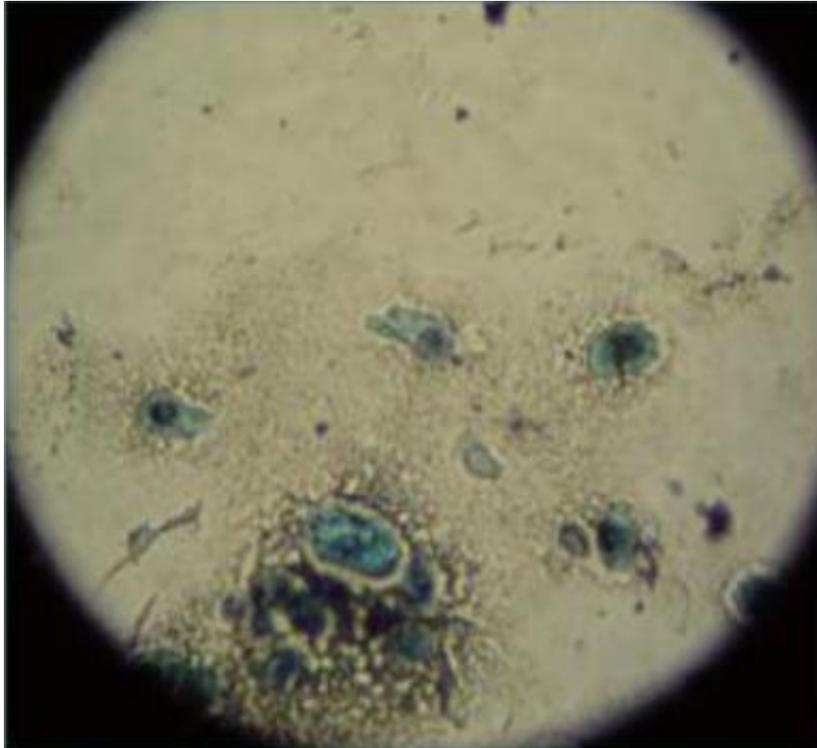


Figura 12. Citología vaginal en anestro (Edens y Health, 2005).

Anestro. Sus características son constantes durante toda la fase, se observan principalmente células parabasales o intermedias pueden encontrarse neutrófilos de manera fisiológica, siempre que sea en pequeñas cantidades no debe haber presencia de eritrocitos porque esto se considerará anormal (Martí, 2011).

III. JUSTIFICACIÓN

El uso de la citología vaginal en perras, para determinar la fase del estro y el momento de inseminación artificial y/o monta natural, es muy útil y es comúnmente utilizada en clínicas veterinarias de pequeñas especies, sin embargo hay un porcentaje de perras que no quedan inseminadas, probablemente por no encontrarse en el momento adecuado para lograr éste objetivo. Por otra parte, existen otras técnicas que determinan con mayor exactitud el momento óptimo para la inseminación, identificando el pico máximo de LH, y las perras quedan preñadas con mayor exactitud pero se necesitan varias pruebas las cuales son de alto costo.

De acuerdo a estos antecedentes y considerando que existen éstas técnicas, la finalidad de la presente investigación es encontrar el uso óptimo entre dos pruebas para determinar el momento justo de inseminación en perras, utilizando la citología vaginal y la prueba Inmuno-Migración Rápida para la detección del pico de LH.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

4.1.1. Determinar el momento óptimo de celo para la inseminación de perras utilizando dos técnicas para la detección del mismo.

4.2. Objetivos específicos.

4.2.1. Utilizar la citología vaginal exfoliativa para determinar la fase del estro identificando las células epiteliales escamosas superficiales y escamas.

4.2.2. Utilizar una prueba Inmuno-Migración Rápida para la detección del pico máximo de LH.

4.2.3. Integrar la concordancia de ambas técnicas para lograr el momento óptimo de inseminación de las perras.

V. HIPOTESIS

El uso de la citología vaginal exfoliativa junto con la detección del pico de LH en perras permite una óptima inseminación en perras.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Descripción del experimento

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio del Hospital Veterinario de Pequeñas Especies de la UAAAN, UL, ubicado en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Periférico Raúl López Sánchez y Carretera Santa Fe S/N, en Torreón, Coahuila, México.

Animales: Se utilizaron 10 caninos hembras entre 2 y 5 años de edad, residentes de las colonias aledañas a la Universidad con signos de proestro-estro. En las 10 hembras se determinó el momento de ovulación, midiendo el pico preovulatorio de hormona LH, utilizando previamente citología vaginal hasta detectar células superficiales y anucleadas (características durante el celo) y posteriormente se midieron los niveles séricos de LH, con una prueba comercial de Inmuno-Migración Rápida para uso en caninos.

6.2. Materiales

Para citología vaginal exfoliativa

- Algodón con alcohol
- Guantes
- Hisopos estériles
- Gotero
- Laminillas
- Cubreobjetos
- Tinción de Wright
- Buffer de Wright
- Microscopio

Para la detección de LH

- Guantes
- Algodón con alcohol
- Torniquete
- Jeringa de 5ml
- Tubo de ensayo al alto vacío tapón rojo
- Centrifuga
- Gotero
- Prueba de Inmuno-Migración Rápida (*Witness LH*) uso en caninos

6.3. Métodos

Se recibieron perras entre 2 y 5 años con signos de proestro-estro durante los meses de marzo, abril, mayo y junio de 2014 a las cuales se les realizaron citologías vaginales hasta detectar células escamosas o superficiales, características del estro, para posteriormente realizar las pruebas de detección de LH, acompañados de las citologías vaginales, para evitar correr pruebas con resultados falsos positivos. La cantidad de citologías y pruebas de LH varió de un animal a otro puesto que el tiempo en días incluso en horas para llegar a células escamosas y posteriormente al pico de LH tiene mucha diferencia entre perras incluso de la misma raza y edad ya que son diversos factores los que intervienen para ello, tales como la estacionalidad, raza, genética, hormonas, alimentación y clima entre otros (Figura 2).

Se realizaron de una a cuatro citologías vaginales hasta detectar células escamosas con el siguiente procedimiento:

Valoración y toma de muestras de la perra.

1. Se registró la historia clínica de cada perra.
2. Se limpió el área genital (vulva).
3. Se introdujo un hisopo estéril por la comisura dorsal de los labios vulvares hasta atravesar el cingulum (unión del vestíbulo y la vagina) para llegar a la porción caudal de la vagina.
4. Se realizaron movimientos giratorios del hisopo para obtener muestra del tejido vaginal.
5. Se retiró cuidadosamente el hisopo.
6. Se realizó un frotis por rodamiento en una laminilla (se realizaron de 2 a 4 tiras del material en ella cuidadosamente)
7. Se tiñó con Wright (se esperaron solo 5 segundos) esta se hizo con un gotero, se tomó del frasco una porción de tinción de Wright y se dejó caer alrededor de 8 gotas por un extremo de la laminilla
8. Se lavó con solución amortiguadora de Wright, el exceso de la tinción y se retiró con la solución amortiguadora mediante un gotero por uno de los extremos
9. Se dejó secar al aire
10. Se observó al microscopio y se interpretó.

Una vez que la citología vaginal mostró células escamosas se empezaron a correr las pruebas de LH sérica con la prueba de Inmuno-Migración Rápida de la siguiente manera:

La prueba es una barra con tres casillas enumeradas; la casilla número 1 corresponde al depósito del suero sanguíneo, la casilla número 2 corresponde al resultado positivo a LH en suero sanguíneo > 1 ng/ml y la casilla número 3 es el poste indicativo de que la prueba está bien hecha.

Toma de muestra de sangre.

1. Se colocó un torniquete en una de las extremidades anteriores
2. Se limpió la zona con una torunda con alcohol
3. Se tomó una muestra de sangre en tubo de ensayo tapón rojo, sin anticoagulante de la vena cefálica
4. Se llevó inmediatamente a centrifugar a 1500 revoluciones/min durante 15 minutos

Procedimiento de la prueba de Inmuno-Migración Rápida para LH.

1. Se sacó la prueba de Inmuno-Migración Rápida de la envoltura plateada y se colocó en una superficie plana y seca.
2. Se tomó una muestra del suero sanguíneo con un gotero, depositándose 3 gotas del suero en la casilla número 1 se espero 20 minutos y se interpretó el resultado en las casillas 2 y 3.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 10 hembras en el estudio, al 30% se les realizó una citología vaginal, a su vez, se fueron tomando pruebas diarias de LH hasta llegar al resultado final donde se mostró el pico preovulatorio de LH; en este caso en el análisis se obtuvo como promedio el uso de 4 pruebas de LH por perra.

Cuadro 1. Número de pruebas realizadas para detectar el pico de estro.

Perra	Edad (años)	Raza	Número de citologías hasta mostrar células escamosas	Número de pruebas hasta mostrar el pico de LH
1	4	Pitbull	6	1
2	2	Bulldog Inglés	4	1
3	5	Criollo	1	5
4	2	Pug	1	3
5	5	Podle	3	1
6	4	Criollo	4	1
7	3	Bulldog Inglés	7	1
8	5	Bulldog Francés	3	2
9	2	Husky Siberiano	1	4
10	3	American Bully	5	1

A dos muestras (20%) se le realizaron 3 citologías y se realizaron de 1 a 2 pruebas de LH. Al resto de las hembras (50%), se les monitoreo mediante 4 a 7 citologías vaginales hasta encontrar la mayoría células escamosas y así proceder a realizar la medición de LH, y en estos casos se utilizó solo una prueba de LH. Los resultados se observan en el cuadro 2.

Se estima que con este método de diagnóstico de Inmuno-Migración Rápida para determinar LH, acompañado de citologías vaginales exfoliativas, se sabrá exactamente el momento en que la perra llega a su pico de LH, por lo que para los criadores será más preciso saber el día en que la perra ovulará

y así poder elegir el momento preciso para el apareamiento o inseminación con éxito.

Cuadro 2. Resultados donde se observa la prueba de detección de LH.

Perra No.	Resultado de la última prueba de Inmuno-Migración Rápida para LH	Relación Citología vaginal/LH
1	Positivo (+)	6 / 1
2	Positivo (+)	4 / 1
3	Negativo (-)	1 / 5
4	Positivo (+)	1 / 3
5	Positivo (+)	3 / 1
6	Positivo (+)	4 / 1
7	Positivo (+)	7 / 1
8	Positivo (+)	3 / 2
9	Positivo (+)	1 / 4
10	Positivo (+)	5 / 1

El método a utilizar para la inseminación o apareamiento de la hembra será decisión del propietario teniendo en cuenta que, hoy en día, es ampliamente reconocido que uno de los factores fundamentales que influyen en el éxito de la IA es el control del periodo fértil de la hembra (Lucas, 2011).

La determinación precisa del momento de la ovulación permite el óptimo manejo reproductivo en las perras (Root, 2001). Algunos de los métodos utilizados para la detección del periodo fértil son el ablandamiento vulvar, durante el proestro el tracto reproductivo se pone edematoso y la vulva y los tejidos perineales se agrandan y se ponen cada vez más turgentes en respuesta al aumento de los estrógenos (England y Concannon, 2002).

Se debe tener en cuenta que la correlación entre los cambios físicos y de comportamiento durante el estro y el tiempo de ovulación es pobre. Los paquetes para la medición de progesterona para uso en clínica, permiten que las concentraciones de progesterona sean determinadas cualitativa o semi-cuantitativamente. Los resultados se obtienen generalmente en un plazo de 45 a 60 minutos de la colección de la muestra. La medición de la progesterona del plasma usando ELISA ha tenido una amplia aceptación clínica y ha producido un incremento significativo de la tasa de preñez (Root, 2001), sin embargo son métodos muy costosos.

Otros exámenes como la endoscopia vaginal o vaginoscopia, permiten observar el comienzo del pico del período fértil, detectado por el inicio de la contracción de la mucosa sin formas angulares excesivas, mientras que la contracción notoria de la totalidad de pliegues de la mucosa con obvia angulación es característica del período de fertilización. Los apareamientos ó las inseminaciones se deben planear para que coincidan con el período de fertilización, cerca de cuatro días después de la primera detección de la contracción de la mucosa, y en el inicio del período de angulación obvia de los pliegues de la mucosa (Root, 2001).

Con el examen ovárico por ultrasonido, es posible supervisar el crecimiento folicular y detectar el momento de la ovulación, También con el examen de la secreción cervico-vaginal se ha demostrado que en un número pequeño de perras se ha demostrado que la resistencia eléctrica de las secreciones vaginales, según lo medido por una prueba comercial de resistencia vaginal, aumenta durante el proestro y el estro temprano, y disminuye durante mediados a fines del estro. Estos cambios pueden por lo tanto ser útiles para indicar el período fértil, aunque La técnica se ha investigado pobremente en la perra doméstica (Root, 2001).

Nuestro estudio con citología vaginal, por medio de una colección seriada, con tinción y examen microscópico de las células exfoliadas del epitelio vaginal demostramos que es un método simple para monitorear la etapa del ciclo estral, aunado al análisis de la LH, midiendo cualitativamente la LH en plasma periférico es un método confiable y exacto para determinar el momento óptimo del servicio, coincidiendo nuestros resultados con otros investigadores (England y Concannon, 2002).

Cada perra es diferente y ninguna raza ovula consistentemente un definido número de días desde el inicio del proestro. Los cambios de comportamiento y físicas en la perra durante el estro son en gran medida variable entre perras y las razas (Littke y Kastelic, 2006).

El monitoreo exacto de cada perra durante cada ciclo estral permite la estimación del momento adecuado para el servicio ó la inseminación. En la perra, los oocitos maduran 2 a 3 días después de la ovulación, y así 4 a 5 días después del pico de LH. El o los servicios se deben planear para que ocurran durante el "período fértil", de 0 a 6 días después del pico de LH, ó preferiblemente en el "período de fertilización", 4 a 6 días después del pico de LH (England y Concannon, 2002).

La especificidad de LH y determinación de la progesterona da una estimación más precisa para cada perra individualmente aumentando la probabilidad de una gestación exitosa, el estudio de la hormona es la medida más precisa de tiempo de la ovulación en las hembras, siendo la LH una de las más comúnmente utilizadas en el hogar, clínicas y laboratorios. El ensayos que miden la concentración de LH en suero o plasma es un método probado y fiable para determinar el tiempo óptimo para aparearse, con la preocupación principal siendo que se debe utilizar diariamente para detectar con precisión el día del pico de LH (Littke y Kastelic, 2006).

Si acompañamos la prueba de Inmuno-Migración rápida LH con citología vaginal exfoliativa estaremos utilizando una medición mas exacta de la ovulación y a la vez estaremos teniendo un ahorro económico. Si no se hace citología vaginal entonces resultará difícil saber en qué momento tomar la primer prueba de LH, ya que como se menciona anteriormente la variación del ciclo ovulatorio es muy diferente de una perra a otra. La citología vaginal es claramente una técnica fácil y útil (Escobedo, 2008).

Aunque los cambios en la citología exfoliativa vaginal no predicen prospectivamente el momento exacto de la ovulación, sí orientan para guiar el punto óptimo de la cópula, pudiendo complementarse el diagnóstico de celo, lo cual indica que la citología exfoliativa vaginal debe ser utilizada para identificar los diferentes estadios del ciclo estral y determinar objetivamente la etapa de celo, para el empleo, o no, de la inseminación artificial o la monta natural (Escobedo, 2008).

Existen diferentes tinciones que pueden ser utilizadas para colorear los extendidos vaginales. Las técnicas más sencillas y rápidas serán las elegidas para realizar en el momento (Stornelli *et al.*, 2006). La tinción modificada de Wright es fácilmente disponible y tiene la ventaja que la preparación de las muestras requiere menos de un minuto (Escobedo, 2008).

Por este motivo en el estudio complementario con citología vaginal exfoliativa utilizamos la tinción de Wright, ya que es el más rápido, después de la evaluación del porcentaje de células escamosas, se decidió tomar la muestra de sangre para correr la prueba de Inmuno-Migración Rápida o posteriormente tomar otra citología vaginal exfoliativa.

Hoy en día es ampliamente reconocido que uno de los factores fundamentales que influyen en el éxito de la IA es el control del periodo fértil de la hembra (Lucas, 2011).

VIII. CONCLUSIONES

La citología vaginal exfoliativa acompañada con la prueba de Inmuno-Migración Rápida para LH son excelentes métodos de diagnóstico de la ovulación.

Los resultados muestran un procedimiento económico para la detección precisa del estro de las perras.

IX. LITERATURA CITADA

1. Beijerink N.J., Kooistra H.S., Dieleman S.J. y Okkens A.C. 2004. Serotonin antagonist-induced lowering of prolactin secretion does not affect the pattern of pulsatile secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in the bitch. *Reproduction*. 128(2):181-188.
2. Caffaratti M., González G., Gorla N. y Guendulain C. 2013. Reproductive Parameters of the Dogo Argentino Bitch. Proceedings of the 7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction - ISCFR, 2012 - Whistler, Canada
3. Cleff M.B., Xavier M.O., Martins A.A., Santin R. y Meireles M.C.A. 2007. Caracterización de la microbiota levaduriforme residente en la vagina de perras en diferentes fases del ciclo estral. *Arch. Med. Vet.* 39(2):153.158.
4. Concannon P.W. 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim. Reprod. Sci.* 124: 200-210.
5. Concannon P.W. 1980. Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulations. *Boil Reprod.* 23:111-117.
6. Concannon P.W., Whaley S., Lein D. y Wissler, R. 1983. Canine gestation length: variation related to the time of mating and fertile life of sperm. *Am. J. Vet. Res.* 44:1819-1821.
7. Chandra, S.A. y Adler, R.R. 2008. Frequency of different estrous stages in purpose-bred beagles: a retrospective study. *Toxicol. Pathol.* 36(7):944-949.

8. De Buen, A.N. 2001. Citología Diagnóstica Veterinaria. Editorial El Manual Moderno. México, D.F. pp 19-22.
9. Edens M.S.D. y Health A.M. 2005. Manejo de la reproducción en la perra y la gata. Manual de reproducción del perro y del gato. Barcelona, España. Ed. Multi-médica. Cap.2. P.15-22.
10. England G.C. y Concannon P.W. 2002. Determination of the optimal breeding time in the bitch: Basic considerations. In Recent Advances in Small Reproduction. Concannon, P.W., England, G.C., Verstegen, J. and Linde-Forsberg, C. (Eds). International Veterinary Information Service (www.ivis.org). Document A1231.0602.
11. Escobedo H.W.S. 2008. Diagnóstico del estro por medio de citología vaginal en perras. Tesis de licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Guatemala.
12. Esquivel L.C. 2012. Ciclo estral de la perra y técnicas utilizadas para su seguimiento. *Vanguardia Vet.* 6-23.
13. Federación Canofila Mexicana A.C (FCM). 2011. Manual de Reproducción Canina. Mexico. P. 23.
14. Feldman E.C y Nelson R. 2000. Endocrinología y reproducción en Perros y Gatos. Editorial McGraw- Hill Interamericana. 2ª Ed. México, D.F.
15. Feldman E.C. y Nelson R.W. 2007. Endocrinología y reproducción canina y felina. Editorial Inter-médica. 3ª ed. Buenos Aires, Argentina. pp. 834-854.

16. Köster K., Poulsen Nautrup C. y Günzel-Apel A.R. 2001. A Doppler ultrasonographic study of cyclic changes of ovarian perfusion in the Beagle bitch. *Reproduction*. 122(3):453-461
17. Lacroix C. 2004. Endocrinología y fisiopatología de la hembra canina. En: Gobello C. Temas de Reproducción de Pequeños Animales. Intermédica. Buenos Aires, Argentina. pp 175-190.
18. Littke J. y Kastelic J. 2006. The use of Progesterone and Luteinizing Hormone Assays to predict Ovulation and peak fertility timing in small animal breeding management programs. Universidad de Lethbridge.
19. Lucas X. 2011. Estado actual de las técnicas de inseminación artificial en la especie canina. Revista de la Asociación Madrileña de Veterinarios de Animales de Compañía. 46:4-10.
20. Mansilla G.E.A. 2008. Inducción de estro y ovulación en perras (*Canis lupus familiaris*) mediante la utilización de extracto hipofisiario equino (HAP). Descripción citológica y clínica. Memoria de Título. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. Valdivia, Chile.
21. Marti A.S. 2009. Aspectos clínicos de la patología uterina. Proceedings of the Southern European Veterinary Conference & Congreso Nacional AVEPA, 2009 - Barcelona, Spain.
22. Martí A.S. y Lafuente C.S. 2011. Reproducción y neonatología canina y felina. Editorial Servet Diseño y Comunicación. Zaragoza, España. pp. 237.

23. Martí A. S. 2013 La piometra en la perra y en la gata. Proceedings of the Southern European Veterinary Conference & Congreso Nacional AVEPA. Barcelona, Spain.
24. Padrón R.S. 1990. Temas de reproducción femenina. La Habana, Cuba. Editorial Científico.Técnica. P. 17-34.
25. Peirano V.M.A. 2008. Obtención y congelación de embriones de perra. Chile. Memoria de tesis. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. Valdivia, Chile.
26. Reece W.O. 2009. Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals. Wiley-Blackwell. 4th Ed. Ames Iowa USA. Pag. 562.
27. Romagnoli S. y Concannon P.W. 2003. Clinical use of progestins in bitches and queens: A review. In: Recent Advances in Small Animal Reproduction P.W. Concannon, G. England, J. Verstegen III and C. Linde Forsberg.
28. Root K.M. 2001. Use of commercial luteinizing hormone and progesterone assay kits in canine breeding management. In: Recent Advances in Small Animal Reproduction. P. W. Concannon, G. England, J. Verstegen III and C. Linde Forsberg (Eds.) Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA.
29. Root K.M. 2012. Reproducción clínica de caninos y felinos. Respuestas basadas en la evidencia. Editorial Intermédica, Buenos Aires Argentina. pp 4-9.
30. Silva-Molano R.F. y Loaiza.Echeverri A.M. 2007. Piometra en animales

pequeños. *Vet. Zootec.* 1(2):71-86.

31. Stornelli M.A., Savignone C.A, Tittarelli M.C. y Stornelli M.C. 2006. Citología vaginal en caninos: Metodología y aplicaciones clínicas. *Veterinaria Cuyana.* pp 15-21.

32. Tsutsui T. 1989. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 39:269-275.

33. Vermeirsch H., Simoens P., Coryn M. Y Van den Broeck, W. 2001. Immunolocalization of androgen receptors in the canine ovary and their relation to sex steroid hormone concentrations. *Reproduction.* 122(5):711–721.

34. Villaseñor A.R. 2007. Revisión bibliográfica de la reproducción del canis familiaris (*perro domestico*). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

35. Wanke M. y Gobello C. 2006. Ciclo estral canino. Reproducción caninos y felinos domésticos. Editorial Intermédica. Buenos Aires, Argentina. pp 1-11.

36. Willingham L.A., Hinrichs K., Westhusin M.E., Kraemer D.C. 2003. Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes in vitro. *Texas. Reproduction.* 126:501–508.

37. Wilson M.S. 2003. Transcervical insemination techniques in the bitch. *Vet. Clin. Nort. Am.* 3(2):291-305.