

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



**“DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN EN PERRAS A
LOS 22 DÍAS POST-MONTA CON LA TÉCNICA
DE RELAXINA”**

POR:

KAREN ISABEL TAPIA ROBLES

TESIS:

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA

OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

OCTUBRE, 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

"ANTONIO NARRO"

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**"DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN EN PERRAS A
LOS 22 DÍAS POST-MONTA CON LA TÉCNICA DE
RELAXINA"**

POR:

KAREN ISABEL TAPIA ROBLES

ASESOR PRINCIPAL

Firma manuscrita de Carlos Raúl Rascón Díaz.

MVZ CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



M.V.Z. RODRIGO ISIDRO SIMON ALONSO

**COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN
REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

OCTUBRE 2012

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



**"DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN EN PERRAS A
LOS 22 DÍAS POST-MONTA CON LA TÉCNICA DE
RELAXINA"**

TESIS POR:
KAREN ISABEL TAPIA ROBLES

Elaborado bajo la supervisión del comité particular y aprobado como requisito parcial para
optar por el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

JURADO:

CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ
PRESIDENTE

MVZ. RODRIGO I. SIMÓN ALONSO
VOCAL

DR. FERNANDO ULISES ADAME DE LEÓN
VOCAL

MC. JOSÉ DE JESÚS QUEZADA AGUIRRE
VOCAL SUPLENTE

MVZ. RODRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

OCTUBRE, 2012

AGRADECIMIENTOS.

A mi “**Alma Mater**” La Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por darme la oportunidad de alcanzar esta meta y heredarme una profesión siendo mi compromiso representarla con orgullo.

Agradezco a los profesores quienes durante los cinco años se esmeraron por dar lo mejor para mi formación profesional, por los conocimientos teóricos y las experiencias vividas.

A mis amigos de generación y a los amigos que hice durante esos cinco años de formación académica compartiendo conocimientos, así como experiencias. Gracias por su nobleza y cariño brindado desde el principio hasta el final. Los quiero mucho.

Jorge Alberto Dávila Bassio.

Marcela Duarte Martínez.

Ramiro Ramos Marín.

José Antonio Rosales López.

José Luis Rodríguez Enríquez.

Sergio Terrazas Calderón.

Luis Enrique Sánchez Toalá.

Juan Carlos Sánchez Toalá.

A mis sinodales por su aceptación, su tiempo, consejos y recomendaciones en este trabajo.

A mi amigo y profesor el MVZ. Carlos Raúl Rascón Díaz el cual fue un motor para continuar con mi preparación profesional y para la realización de este trabajo. Gracias por tus buenos consejos así como de tu buen humor y carisma.

Quiero agradecer especialmente con toda mi admiración por su comprensión, enseñanza, dedicación, paciencia, cariño y su apoyo incondicional en todo momento para mi preparación profesional, MVZ. Rodrigo Isidro Simón Alonso.

Al Dr. Fernando Ulises Adame de León. Agradezco el confiar y creer en mí, así como sus buenos consejos, cariño y apoyarme en todas las etapas de mis cinco años como estudiante. Teniéndolo como un ejemplo a seguir.

Mi estimado amigo, profesor y compañero MC. José de Jesús Quezada Aguirre. Que desde el primer año de mi carrera estuvo al pendiente de mí y de mis amigos. Agradezco infinitamente el buen trato hacia a mi, la gran amistad y cariño brindado que es correspondido.

A mi Director Regional el Dr. Rafael Rodríguez Martínez por sus consejos, su sabiduría y su gran amistad brindada en mi etapa como estudiante así como Consejera Universitaria.

Y a todas las personas que en forma directa e indirecta hicieron posible mi formación académica.

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de vivir y darme fortaleza, paciencia y sabiduría en los momentos más difíciles. Así como permitirme llegar a esta etapa de mi vida y poner a personas maravillosas en mi camino.

A mis padres: German Tapia García y Ma. Isabel Robles Marrufo. Que gracias a ustedes he llegado a esta etapa de mi vida. Poniendo en práctica los valores inculcados y reconociendo su infinito esfuerzo por educarme y formarme. Esta tesis se las dedico con mucho cariño a ustedes que son lo mejor que tengo en mi vida, agradeciendo el amor incondicional que siempre me han demostrado. Los quiero mucho.

A mis hermanas Mayra E. Tapia Robles y Daniela Tapia Robles. Ustedes han sido un gran apoyo en mi vida y en mi carrera. Gracias por sus consejos, ayuda y paciencia.

INDICE DE CONTENIDO.

AGRADECIMIENTOS.....	I, II
DEDICATORIA.....	III
INDICE.....	IV, V
I. RESUMEN.....	VI
II. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Métodos de diagnóstico.....	2
2.1.1 Palpación abdominal.....	2
2.1.2 Radiografía	3
2.1.3 Ultrasonido.....	3
2.1.4 Niveles de relaxina en sangre.....	3
1.2 Justificación.....	4
1.3 Objetivo	4
1.4 Hipótesis	4
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. Introducción.....	5
3.2. Eventos Reproductivos del Ciclo Estral.....	6
3.2.1. Etapas del ciclo.....	7
3.2.2. Pico preovulatorio de LH.....	8
3.2.3. Fertilización.....	9
3.2.4. Formación de cuerpo lúteo.....	10
3.2.5 Reconocimiento materno.....	11
3.2.6. Implantación.....	12
3.2.7. Endocrinología de la gestación.....	14
3.2.8. Hormona relaxina.....	15

IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
	4.1. Materiales.....	18
	4.2 Animales.....	18
	4.3. WITNESS Relaxin.....	18
	4.4. Métodos.....	18
	4.5. Descripción de la Técnica WITNESS Relaxin.....	19
	4.6. Como Realizar la Prueba.....	20
	4.7. Conservación de Muestras.....	20
	4.8. Modo de Empleo.....	20
	4.9. Lectura de Resultados.....	22
V.	RESULTADOS	23
VI.	DISCUSIÓN.....	27
VII.	CONCLUSIONES.....	27
VIII.	RECOMENDACIONES.....	28
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	29

INDICE DE FIGURAS

Fig. 3.1.....	8
Fig. 3.2.....	19
Fig. 5.1.....	26

I. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue realizar un diagnóstico de gestación por medio de un ensayo inmunoenzimático en perras, midiendo su eficacia de este a los 22 días de gestación.

Se utilizaron 5 hembras caninas de diferentes razas y edades, con antecedentes de al menos un parto y clínicamente sanas.

El periodo experimental abarcó los meses de octubre 2011 a mayo 2012. A cada hembra se le tomaron muestras sanguíneas, de la vena cefálica a los 22 días de gestación, contando a partir de la última monta.

Las muestras fueron obtenidas con tubos de ensayo heparinizados los cuales se transportaban en hieleras con refrigerantes y se procesaban en no más de 4 horas de obtenida la muestra.

El diagnóstico de gestación se realizó con un ensayo inmunoenzimático, el cual detectó la presencia de relaxina en sangre, de esta manera fueron identificadas las gestaciones, pseudogestaciones y no gestación.

Se pudo evaluar este método de diagnóstico, así como su eficacia a partir de los porcentajes de eficacia los 22 días de gestación. Teniendo un porcentaje de eficacia a los 22 días de 60%. Y 93.3% de efectividad.

El diagnóstico se corroboró con una prueba radiográfica y ultrasonido a los 45 días de gestación.

PALABRAS CLAVE: Monta, Ovulación, Relaxina, Celo y Gestación.

II. INTRODUCCIÓN.

El diagnóstico de gestación en las especies domesticas tiene como objetivo principal determinar con la mayor brevedad posible si la hembra quedó o no gestante en su último servicio, ya que al saber si no está gestante esta hembra, se podrán tomar las medidas necesarias a fin de que el siguiente ciclo reciba un servicio efectivo, de esta manera se evita el alargar el periodo de días abiertos que redundan en una pérdida económica para el productor por tener animales improductivos en su explotación. La perra, sin embargo, la situación difiere en cuanto a que el determinar la no-gestación de la hembra, no permitirá proporcionar un servicio inmediato, puesto que en esta especie puede transcurrir desde cinco hasta nueve meses para que ocurra el siguiente ciclo (Esquivel y Rivera.,2001).

La razón para hacer el diagnóstico de gestación en esta especie en particular, obedece a razones de manejo como es el evitar el gasto extra que significa proporcionar alimentación especial a hembras supuestamente gestantes, así mismo permitirá la optimización en el uso del área de parideros (Esquivel y Páramo, 2001a).

Otras ventajas son que en el supuesto caso de un brote infeccioso se pondrán aplicar los tratamientos pertinentes, lo que no puede hacerse cuando una perra esta gestante ya que algunos de los fármacos producen alteraciones teratogénicas (Rivera y Esquivel, 2001).

También es posible acortar el tiempo que se necesite para conocer la posible fertilidad o infertilidad de los machos para decidir si un macho se sigue utilizando o evitar utilizarlos (Esquivel y Páramo, 2001b).

2.1 Métodos para el Diagnostico de Gestación en la Perra.

2.1.2 Palpación abdominal.

Se puede realizar a partir de los 25 días de gestación pero su principal desventaja es que el operador requiere que cierta pericia además de que la rigidez del abdomen de algunas perras obesas no permite detectar al (los) producto(s) con facilidad, y por lo tanto, el palpador puede confundir estructuras fetales con excremento y es difícil identificar el número de cachorros (Root-Kustritz, 1999; Esquivel y Páramo, 2001a).

2.1.2 Radiografía.

Se puede realizar a partir de los 40 días de gestación que es cuando ocurre la mineralización de las estructuras fetales, aunque se sugiere realizar este estudio en el día 50 para evitar errores de interpretación, esta técnica, tiene la desventaja que el diagnostico se debe hacer en el último tercio de la gestación ya que de no ser así, puede suceder que los productos no se aprecien en la placa y pudiendo tener efectos teratogénicos (Esquivel y Páramo, 2001b).

2.1.3 Ultrasonido.

La ultrasonografía, es una técnica reciente, segura, fácil y rápida, que aporta información al médico acerca de su paciente, y lo ayuda a llegar más fácilmente a un diagnóstico preciso encontrándose ampliamente difundido en medicina humana, sobre todo en las áreas de ginecología y obstetricia. En medicina Veterinaria su empleo se ha dirigido básicamente a investigación, por ejemplo, en estudios anatómicos, como la biometría ocular en caninos. Su aplicación en ginecología y obstetricia veterinaria se está investigando con mucho éxito en especies domésticas

y en especies silvestres en cautiverio como cabras monteses ciervos y dingos. En el caso de la perradoméstica, la ultrasonografía puede ser de gran ayuda ya que permite establecer un diagnóstico temprano y confiable de gestación evitando al dueño el gasto extra por concepto de alimentación especial a hembras supuestamente gestantes. Se puede realizar a partir de los 18 días de gestación, teniendo más precisión si se realiza a los 30 días después de la última monta. Es una técnica totalmente inofensiva para la perra y para los productos, además, permite observar la viabilidad fetal e incluso calcular la edad gestacional (Concannon *et al.*, 1989; Esquivel y Rivera, 2001).

2.1.4 Niveles de fibrinógeno en sangre.

Otra de las técnicas utilizadas en la Medicina Veterinaria para el diagnóstico de gestación en perras es la determinación de niveles de fibrinógeno en sangre, ya que los niveles de fibrinógeno aumentan después de la implantación por la producción elevada de placenta, pudiendo medirse el día 19 de gestación, siendo esta una técnica de un valor económico elevado por su difícil determinación en laboratorio (Concannon *et al.*, 2000).

2.1.5 Niveles de relaxina en sangre.

A 22 días después de la última monta se elevan los niveles de relaxina y solamente es característico de la especie de los caninos, por lo tanto se puede identificar la presencia de esta hormona por medio de la técnica de ensayo inmunoenzimático, siendo esta una técnica confiable y barata (ReproCHEK Synbiotics USA, 2002).

2.2 Justificación.

Tener un diagnóstico de gestación seguro y confiable permitirá predecir el momento del parto sobre todo para realizar una correcta planeación en instalaciones, alimento, detectar algunas entidades patológicas que pueden ser atendidas a la brevedad y para evitar involucrar la vida de la perra como de los productos.

Por todas estas razones se pondrá un especial énfasis en evaluar la gestación en perras con la técnica de relaxina.

2.3 Objetivo.

El objetivo primordial del presente trabajo, es el de realizar un diagnóstico con una técnica confiable, rápida e inocua para la perra.

Se evaluará el diagnóstico de gestación en perras a los 22 días post-monta con la técnica de relaxina.

2.4 Hipótesis.

La presencia de relaxina en sangre deberá detectarse a partir del día 22 de la gestación después de la última monta. Ya que por lo general, la implantación sucede a partir del día 22 en la perra, comenzando a elevar los niveles de relaxina en sangre.

III. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.

3.1 Introducción.

El diagnóstico de gestación por medio del ensayo inmunoenzimático comercial que detecta la presencia de relaxina en la sangre se comenzó a utilizar en el año 2001. El kit de prueba para determinar la gestación en caninos utiliza anticuerpos altamente purificados y específicos para detectar la presencia de la hormona relaxina en sangre completa o en plasma, la presencia de cantidades detectables de relaxina (8ng/ml) indica gestación (Buffet *et al.*, 2001).

Buffet *et al.* (2001) demuestran que esta forma de diagnóstico es altamente confiable en la determinación de exitosos o fallas de un apareamiento planeado o a una monta accidental. Esta prueba puede ser utilizada para detectar descensos inesperados en los niveles de relaxina que nos indica que hubo una reabsorción embrionaria. Steinetz *et al.* (1990a) confirma que la relaxina comienza a producirse cuando hay implantación de un huevo fértil, esto generalmente ocurre del día 26 al 31 después del pico preovulatorio de LH, menciona que hay variación biológica, tales como el tiempo de maduración del huevo y el tiempo de fertilización.

Esquivel y Páramo (2001a) mencionan que el periodo fértil en los caninos es comúnmente de 4 a 7 días después del pico preovulatorio de LH, a causa de variadas estrategias de cruzamiento y diferentes métodos de conteo usados para determinar las fechas de parto, puede haber una confusión, es mejor el utilizar como punto de referencia la fecha de la monta, Esquivel y Páramo (2001a) comentan “Estas fechas pueden y no corresponder al periodo fértil o al ciclo estral de la perra y al día que ocurrió la fertilización” en general si la perra fue cruzada en el tiempo apropiado en su ciclo estral, la preñez puede ser determinada de 22 a 27 días después de la cruce, que es de 26 a 31 días después del pico preovulatorio de LH (Tsutsui, 1989)

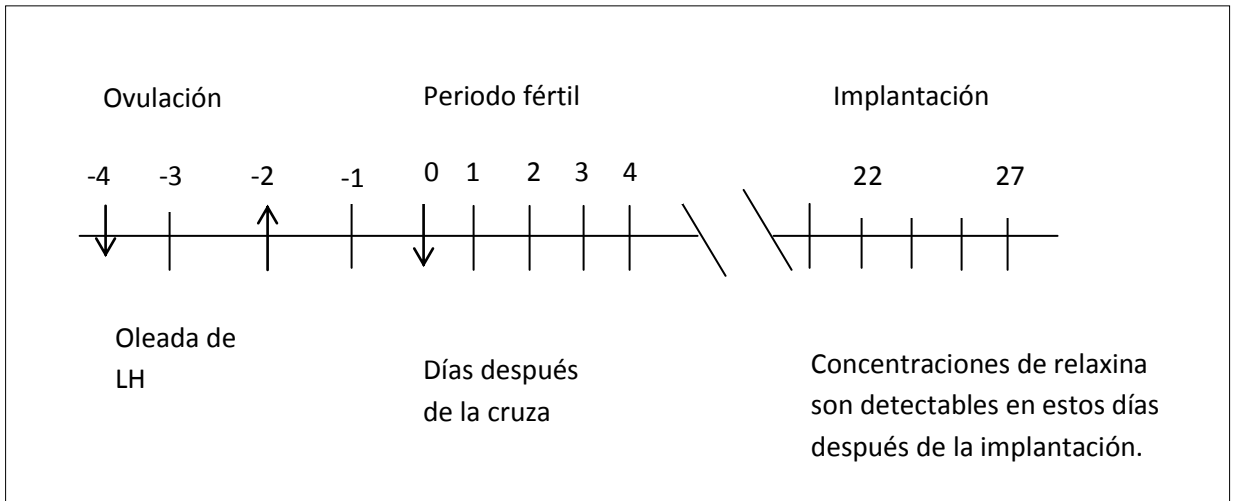


Fig. 3.1.

Figura 3.1. el día de la última monta es indicando como día 0, asumiendo que la fertilización ocurre en el día de la última monta, la implantación del huevo fertilizado y el incremento de relaxina en niveles detectables es en los días 22 a 27 después de la última monta (Steinetz et al., 1990c).

Concannon et al. (2000) menciona que la gestación es posible en las primeras cruas debido a que las células espermáticas sobreviven un promedio de 24 a 48 hrs. en el útero.

El ensayo inmunoenzimático está compuesto de microceldillas, estas están cubiertas con anticuerpos policlonales antirelaxina. Un segundo anticuerpo altamente específico a la relaxina es adicionado con la enzima peroxidasa (HRP), por lo cual, la muestra debe ser probada dentro de la celdilla. La relaxina presente en la muestra se une a la celdilla con el conjugado de HRP-anticuerpos. Se le adiciona un sustrato cromogénico, el cual forma una reacción, tiñendo de color azul en caso de gestación (ReproCHEK, synbiotics USA, 2002; Sunnet *al.*, 2002).

Para tener una idea más clara de la función de esta hormona es factible hacer una revisión desde el ciclo estral hasta la endocrinología de la gestación.

3.2 Eventos Reproductivos del Ciclo Estral.

3.2.1 Etapas del ciclo.

Esquivel y Páramo (2001b) clasifican a la perra como un animal monoestrico estacional que puede presentar de uno a tres ciclos estrales en un año con un intervalo de tres a nueve meses, dividiendo el ciclo en cuatro fases:

Anestro: Tiene una duración de tres a nueve meses, sin evidencia clínica de actividad ovárica.

Proestro: Su duración es de tres a 20 días y se caracteriza por el incremento de las concentraciones sanguíneas de estrógenos lo que provoca los signos clínicos como la atracción de los machos, aumento en el tamaño de la vulva y región perineal y una descarga sanguinolenta originada en el útero por diapédesis.

Estro: Su duración es de tres a 20 días y se caracteriza por un comportamiento de receptividad sexual provocado por un decremento en el nivel de estrógenos y un aumento en los niveles de LH. En este periodo, la perra puede seguir presentando descarga sanguinolenta por la vulva.

Diestro: Su duración es de 63 días en la perra gestante y hasta 100 días en la perra no gestante.

3.2.2 Pico preovulatorio de LH.

El cambio de comportamiento de la perra hacia la receptividad sexual no siempre coincide con el pico preovulatorio de LH, por lo tanto, no coincide con el inicio de periodo fértil (Estro). De tal manera, que en términos endocrinos, el periodo fértil inicia cuando los estrógenos disminuyen y el pico de LH aparece, que resulta difícil de detectar dando como resultado la constante confusión de creer que la fertilidad inicia cuando la perra acepta la monta que como se dijo anteriormente, no siempre ocurre; por lo tanto, se debe implementar otras alternativas como citología vaginal exfoliativa o la vaginocopia para detectar el momento óptimo para realizar la monta o la inseminación artificial (James, 1991; Concannon *et al.*, 2000).

Esquivel y Páramo (2001a) mencionan que el incremento de la LH produce un rápido crecimiento y maduración de los folículos provocando ovulación (36 a 50 horas después), además de producir una transformación de las células productoras de estrógenos (folículos de 3 a 4 mm) en células productoras de progesterona (cuerpo luteo de 8 a 9 mm). Este fenómeno marca la transición de la fase folicular a la fase lutea y tiene una duración de uno a tres días.

En la mayoría de los ciclos estrales, el pico de LH se presenta en el día de la transición de proestro a estro, sin embargo, en algunos ciclos estrales el principio del estro y la primera cópula puede ocurrir dos a tres días antes del pico de LH e incluso hasta cuatro a cinco días antes (Concannon, 1993). Situación que no garantiza una gestación cuando la perra ha recibido una

sola monta, por lo que es muy importante programar el número suficientes de montas para garantizar el éxito de las mismas (Esquivel y Páramo, 2001b).

3.2.3 Fertilización.

La fertilización se lleva a cabo en la ámpula del oviducto. Para que la fertilización se realice es necesario que el ovulo sea maduro (ovocito secundario) situación que en la perra no es inmediata, ya que esta especie, ovula en estadiodeovocito primaria y aproximadamente 108 horas después, alcanza su segunda divisiónmeiotica para convertirse en un ovocito secundario. Este es un buen argumento para decidir que la perra deberá aparearse más de una vez (Tsutsui, 1989).

Los embriones permanecen en el oviducto de seis a 12 días, tiempo en el que alcanzan elestadiode desarrollo conocido como mórula tardía (32 células) o blastocito temprano (64 células) para posteriormente llegar al útero. En el útero los embriones permanecen flotando en el cuerpo ipsolateral al oviducto en el que ocurrió la fertilización. Se alimenta del material nutritivo contenido en el saco vitelino de las propias reservas del ovulo presentes antes de la fertilización y de las secreciones uterinas, conocida como leche uterina o histotrofe, todo este fenómeno toma aproximadamente seis días y se ha detectado que los blastocitos crecen en este tiempo de 0.3 hasta 2mm para implantarse posteriormente, lo cual se presenta 17 a 21 días después de la fecundación (Tsutsui, 1989; Zarco, 1993; Sunder y Lenton, 2000).

Montas forzadas realizadas dos días antes del pico de LH rara vez son fértiles, sin embargo, cuando la perra queda gestante la duración de esta gestación generalmente es más larga (68 días) lo cual en ocasiones confunde a los propietarios de perras por lo que la recomendación es detectar oportunamente el periodo fértil, programar el número adecuado de montas y empezar a contar la gestación a partir de la última monta (Concannon, 1993).

3.2.4 Formación del cuerpo lúteo.

La formación del cuerpo lúteo se inicia con cambios morfológicos y bioquímicos de las células de la teca interna y de las células de las granulosa del folículo preovulatorio. En la perra, estos cambios se presentan al final del proestro (Root-Kustritz, 1999). Básicamente, el cuerpo lúteo se deriva de las células de la teca y la granulosa las cuales son productoras de esteroides foliculares. Estas células se transforman en dos distintos tipos celulares (chicas y grandes) 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 luteinizadas y se les conoce como células tipo II o células II (Tsutsui, 1989).

Ultraestructuralmente, las células grandes contienen una gran cantidad de mitocondrias, abundante retículo endoplasmico liso y un gran número de gránulos de secreción (Concannon *et al.*, 1989). Por otro lado, la apariencia de las células chicas es distinta ya que contiene un número moderado de mitocondrias, escaso

Retículo endoplasmico liso, carecen de gránulos de secreción y contiene numerosas gotas de lípidos las cuales no han sido observadas en las células grandes (Sunder y Lenton, 2000).

La producción de progesterona (80%) es por parte de las células grandes del cuerpo lúteo las cuales contienen poca cantidad de receptores para LH en comparación con las células chicas, las cuales contienen la mayoría de los receptores para LH. Así mismo, las células grandes contienen la mayoría de los receptores para PGF2 α (Steinetz *et al.*, 1990b).

Diversos estudios realizados en ovejas han informado que la relación entre las células grandes y células chicas es el factor más importante para entender la regulación en secreción de progesterona y la destrucción del cuerpo lúteo; desafortunadamente, en el caso del cuerpo lúteo de la perra no

se ha realizado estudios que permitan comprender estos fenómenos aunque se sabe que en los carnívoros del cuerpo lúteo presentan diferencia en el tamaño celular (Concannon, 1993).

3.2.5 Reconocimiento materno de la gestación.

Este fenómeno se presenta en la hembra después de la fertilización. Como es sabido, las hembras clasificadas como poliestricas continuas presentan ciclos estrales en forma constante pero, cuando están gestantes, aparecen una serie de eventos para que el próximo ciclo no se inicie, por lo que al conjunto de estos eventos se les conoce como reconocimiento materno de la gestación que básicamente está encaminado a evitar la destrucción del cuerpo lúteo, es decir, la presencia de esta estructura y la producción de progesterona es necesaria para el mantenimiento de la gestación, si la hembra no queda gestante, entonces el cuerpo lúteo se destruye, los niveles séricos de progesterona disminuyen, se produce una retroalimentación negativa hacia el hipotálamo que los estimula para producir hormona liberadora de gonadotropinas (GnrH) y se presenta el arranque de un nuevo ciclo estral (Esquivel y Páramo, 2001a). Concannon *et al.* (1989) enumeran una serie de factores por los cuales aseguran que en la perra no existe un mecanismo de reconocimiento de la gestación los cuales son:

A) No es una especie continua ya que presenta una etapa de anestro que puede durar de tres a nueve meses.

B) el cuerpo lúteo permanece sin importar si existe o no la gestación, de tal forma, que la perra estará bajo la influencia de progesterona durante 63 días si queda gestante hasta 100 días si queda vacía.

C) El embrión canino, no produce ninguna señal química que sirva como mensaje para evitar la destrucción del cuerpo lúteo.

D) La instrucción para la formación de la placenta está dada por intervención del código genético del embrión y no por instrucción del útero como sucede en otras especies.

E) El mecanismo de luteólisis por medio de prostaglandina en la perra, al parecer solo se presenta en el momento del parto pero todavía hay duda en la comunidad internacional.

3.2.6. Implantación

La placenta de la perra desde el punto de vista histológico, se clasifica como endotelocorial. Esta forma se presenta en carnívoros (perros y gatos) se constituye de 4 capas histológicas, el epitelio endometrial se pierde, así como el tejido conectivo uterino, por lo que, el corión se pone en contacto directo con el endotelio de los vasos sanguíneos maternos (Zarco, 1993; Sunder y Lenton, 2000).

Por su morfología se clasifica en zonal, el corión se recubre de vellosidades formando una banda en la zona media del saco corionico; esta banda mide de 2.5 a 7 cm. La placenta de acuerdo a la posición que el embrión ocupa con respecto a las paredes del útero en la perra es central, el feto ocupara durante la gestación la cavidad natural del lumen uterino (Esquivel *et al.*, 2001a).

Según Concannon *et al.*, (1989) en esta especie la implantación de los embriones es de 17 a 21 días después de la fecundación y ocupan ambos cuernos uterinos sin importar el ovario del que proceden. El útero presenta sitios de implantación aproximadamente de 1 cm de diámetro caracterizados por ser zonas de inflamación que presentan edema (decidua).

Los blastocitos se elongan debido a una hiperplasia del trofoblasto con el propósito de ser inmovilizados dentro del útero para después establecer la

conexión con la madre a través de la placenta. Otra característica de la placenta es que el sincitiotrofoblasto estimula en el endometrio el desarrollo de hematomas que contienen sangre materna de la cual las sustancias nutritivas y algunos minerales como el hierro, pasaran al embrión a través del cordón umbilical (Sunder y Lenton, 2000).

Con base a la clasificación de la placenta, es importante decir que durante el parto, el cachorro puede ser expulsado simultáneamente con sus respectivas membranas o en ocasiones separados de ellas y solo unido a éstas por medio del cordón umbilical. Lo que significa, que la retención placentaria en los cánidos es poco frecuente e incluso en el parto solo se habla de dos etapas y no de tres como en otras especies (Concannon *et al.*, 1989).

Existe duda de que la placenta de la perra produzca progesterona como en el caso de la vaca y la oveja de tal forma que se considera que el aporte pro gestacional es principalmente de origen ovárico (Esquivel *et al.*, 2001a).

3.2.7 Endocrinología de la gestación.

La reproducción es controlada por la acción del eje del hipotálamo- hipófisis- ovario, relación conocida como componente del control general de la reproducción. De estos órganos, el papel que juega la hipófisis en el mantenimiento del cuerpo lúteo y de la gestación no es muy claro en los caninos, ya que se ha detectado que la cantidad de la hormona luteinizante (LH) durante la parte final del estro, la primera mitad de la gestación y los primeros 30 días de la etapa de diestro, ésta glicoproteína permanece baja y es hasta después del día 30 del diestro o en la primera mitad de la gestación cuando se detecta un incremento en su nivel sérico (Songet *et al.*, 2001a).

Esquivel y Páramo (2001a) comenta que existe evidencia de que la LH y la prolactina son necesarias tanto para mantener el cuerpo lúteo del diestro como para la gestación, ya que, si la hipófisis es retirada en cualquier momento del diestro o de la gestación, el cuerpo lúteo se destruye y por lo tanto la gestación termina.

La hormona folículo estimulante (FSH), se incrementa en la parte final de la segunda mitad de la gestación, evento que se ha relacionado con el incremento en el nivel de estrógenos que aparece ligeramente aumentado

(20pg/mL) con respecto a su nivel basal (5 a 15 pg/mL) en este tiempo. Al parecer esta secreción de estrógenos sirve para promover el desarrollo mamario y quizás ayudar a la relajación del cerviz durante el parto (Hsuet *al.*, 2002).

Se ha encontrado evidencia en algunos estudios sobre variaciones en los niveles de hormonas tiroideas y cortisol, los cuales al parecer dependen del estado en el que esté la perra, por ejemplo, la estimulación con hormonaadrenocorticotrópica (ACTH) produce variaciones en el nivel de cortisol dependiendo de la etapa reproductiva como son: el proestro, anestro, diestro y la gestación sin llegar a una explicación completa de estos fenómenos (Steinetz *et al.*, 1990a).

Una hormona que sé a comenzado a estudiar recientemente es la relaxina, por lo que es necesario mencionar su comportamiento dentro de la hembra gestante.

3.2.8 Hormona relaxina.

Algunas investigaciones han confirmado que los aumentos de la relaxina en sangre obedecen a la implantación de un huevo fertilizado. La relaxina es una hormona polipeptídica, la cual ha sido detectada en el ovario, útero y placenta de los mamíferos (Steinetz *et al.*, 1990b; Stewart *et al.*, 1992; Boockfor *et al.*, 2001).

El DNA de la relaxina canina consiste en 534 pares de bases codificadas en una proteína de 177 aminoácidos, un dominio C de 93 aminoácidos y un dominio A de 24 aminoácidos. La relaxina es una hormona importante para el crecimiento y la remodelación de tejidos reproductores y otros ligados a la gestación (Stewart *et al.*, 1992; Dschietzig *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2001a).

La bioactividad de la relaxina se descubrió en placentas y ovarios, por lo tanto esta información nos da una evidencia de que estos órganos son una fuente dual de producción de esta hormona en la perra gestante (Klonisch y Hombach-Klonisch, 1999; Bjorklund *et al.*, 2000).

El sitio exacto de la producción de relaxina en la perra es en los sincitiotrofoblastos de la placenta canina. Los niveles de relaxina comienzan a aumentar desde el día 22 alcanzando su pico máximo en la semana 8 de gestación, por lo tanto es una manera bastante confiable de hacer un diagnóstico preciso (Peters, 1999, Osman, 2000; Gerson *et al.*, 2001). Se han encontrado las concentraciones más altas de relaxina en los tejidos de la placenta, estos hallazgos indican que la fuente principal de relaxina en la perra es la placenta. Por lo tanto, teniendo presencia de relaxina en sangre se puede diferenciar de una seudogestación (Tsutsui y Stewart, 1991; Bullesbacht *et al.*, 1999, Plesnera y Kuznetsova, 2000).

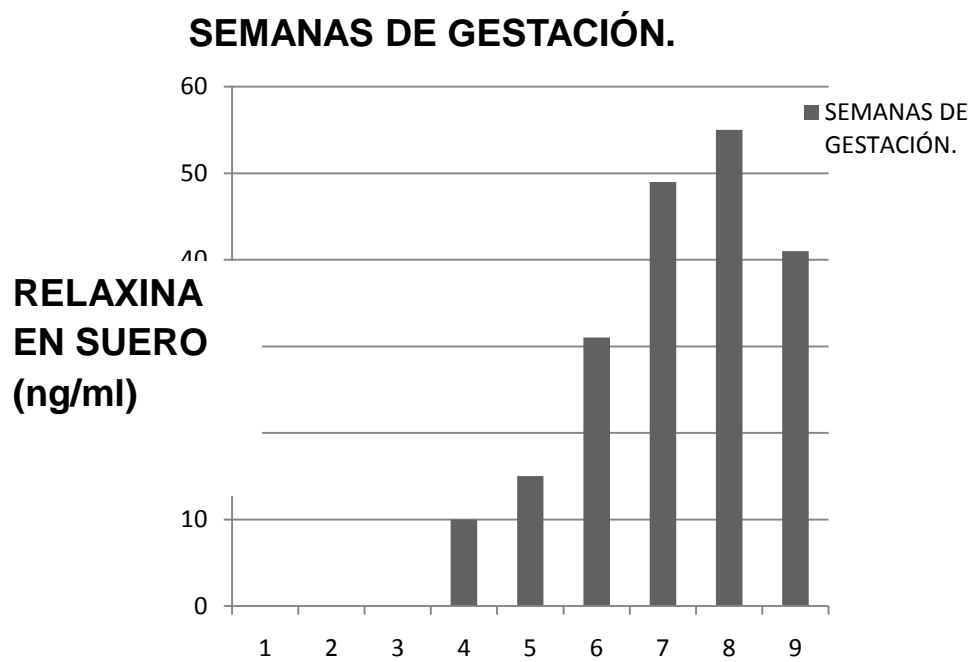


Fig. 3.2 Niveles de relaxina durante la gestación de la perra (Steinetz, 1989).

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Material.

- 1) 5 pruebas **WITNESS® Relaxin**.
- 2) 5 pipetas.
- 3) 5 jeringas de 3ml con agujas del N.22
- 4) 1 Soluciones Buffer.
- 5) Centrifuga.
- 6) Cronometro.
- 7) Rollo de toallas de papel.

4.2 Animales.

Se utilizaron 5 hembras caninas de diferentes razas, diferentes edades, que hubieran tenido una gestación y un parto anterior al estudios.

4.3 WITNESS® Relaxin:

a) Perra

- Monitorear la gestación
- Perra o gata con estatus desconocido
- Antes de posible aborto médico.
- Confirmación de gestación no deseada antes de tratamiento abortivo

b) Gata

- Confirmación de reabsorción fetal.
- Evaluación de la necesidad de tratamiento pseudo-gestación.

4.4 Métodos:

Se llevó un control de las 5 perras, las cuales como requisito para realizar el estudio, era que hubiera presentado un parto anterior al estudio, se les formulo un cuestionario el cual consistía en los siguientes puntos:

- 1) Nombre del propietario.
- 2) Dirección.
- 3) Teléfono.

- 4) Nombre de la perra.
- 5) Edad.
- 6) Peso.
- 7) Raza.
- 8) Fecha del celo anterior.
- 9) ¿se apareo?
- 10) Cuando comenzó este celo.
- 11) ¿Se apareo por primera vez?
- 12) ¿La ultima monta?
- 13) Fecha para la primera prueba (22 días).
- 14) Fecha para la segunda prueba (28 días).
- 15) Fecha para diagnóstico con radiografía o ultrasonido.
- 16) Fecha de parto.
- 17) Firma del asesor.

Se les tomaron muestras a todas las perras a los 22 días después de la última monta.

4.5 Descripción de la Técnica WITNESS® Relaxin

La prueba es de fácil manejo, basado en una técnica de inmunomigración rápida. Utiliza dos anticuerpos dirigidos contra la relaxina y permite la identificación rápida de la presencia de molécula en las muestras biológicas (Suero o Plasma) de la perra y la gata.

Se pone en contacto la muestra (suero o plasma) conteniendo la relaxina con las partículas de oro coloidal sensibilizadas por el primer anticuerpo. El complejo formado migra por una membrana de nitrocelulosa hasta ser capturado en una zona reactiva (Segundo anticuerpo), acumulándose hasta

provocar la formación de una banda rosa claramente visible. Una banda de control situada en el extremo de la membrana confirma que la prueba se ha realizado correctamente.

4.6 Como Realizar la Prueba.

- Para la muestra con plasma, debe ser obtenida con anticoagulante (EDTA, heparina o citrato).
- Las muestras deben extraerse siempre con jeringa y aguja estéril.
- La hemolisis no interfiere de una muestra significativa con la prueba aunque una muestra muy hemolizada puede crear un ruido de fondo (hemoglobina) que podría perturbar la lectura en caso de reacción débilmente positiva.

4.7 Conservación de las Muestras:

Las muestras deben ser analizadas preferentemente de inmediato después de la extracción. Si no, la muestra puede conservarse a temperatura ambiente 4 horas después de la extracción. Entre más de 2° y 8°C durante 48 horas.

Para una conservación prolongada, se recomienda congelar la muestra a -20°C.

4.8 Modo de Empleo:

Se colocan 2 gotas de muestra y del conjugado sobre el pocillo

Evitar tocar la membrana mientras se aplica la muestra o gotas del conjugado.

1-. Distribución de la muestra.

- Abrir el sobre, retirar la prueba y situarla sobre una superficie plana y horizontal para la realización de la misma.

- Utilizar la pipeta para recoger la muestra y sujetarla verticalmente para depositar dos gotas de muestra plasma o suero en el pocillo ventana (1).
- No utilizar sangre entera.

2-. Distribución de la Solución Conjugado.

- Asegurarse que la muestra ha penetrado en la membrana.
- Aplicar dos gotas de la solución conjugada, manteniendo el frasco en posición vertical, en el pocillo de la muestra.
- Mantener la prueba sobre una superficie plana durante todo el tiempo de migración del complejo muestra / reactivo por la membrana.

3-. Lectura de la prueba.

- Esperamos 10 minutos para observar la presencia o no, de bandas de color purpura en las ventanas.
- La banda del resultado aparece en la primera ventana.
- La banda de control aparece en la segunda ventana.
- La lectura de la prueba puede realizarse en menos de 5 minutos si dos bandas de color purpura aparecen claramente en las ventanas.
- Sin embargo la aparición de una única banda purpura en la segunda ventana, no permite dar por concluido la prueba antes de los 10 minutos los cuales son necesarios para la migración completa. Puede que la banda del resultado en la primera ventana aparezcan después que la segunda ventana.

4.9 Lectura de Resultados.

1. Validación:

La prueba es valida si aparece una banda control en la segunda ventana.

2. Interpretación.

Ausencia de banda purpura en la primera ventana, y aparición de una banda purpura en la segunda ventana es negativo: la prueba es negativo para relaxina.

Aparición de la banda purpura en la primera ventana, y aparición de una banda purpura en la segunda ventana: la prueba es positivo para relaxina.

Nota.

La ausencia de una banda purpura en la segunda ventana inválida la prueba.

El resultado de cualquier prueba biológica debe interpretarse en función del contexto clínico y epidemiológico del animal.

Muestras Negativas: Un resultado negativo significa que la relaxina esta ausente de la muestra o que se encuentra aun en cantidad demasiado baja para poder ser detectada (diagnostico demasiado precoz para ser certero). El uso de una segunda prueba después de una semana permitirá confirmar la ausencia de gestación o presencia de la misma, sobre todo en caso de incertidumbre relativa a la fecha de ovulación. Dos resultados negativos separados, como mínimo por una semana, pueden ser requeridos para la confirmación de la usencia de preñez, especialmente cuando la fecha de la ovulación (o de la monta) es desconocida. La ausencia de gestación solo puede ser confirmada con certeza a partir del día 27 (perras) post- ovulación (31 días post-monta en gatas).

5 RESULTADOS.

Los resultados obtenidos al realizar la prueba del ensayo inmunoenzimático fue el siguiente:

N° Perra	Raza	Edad	Fecha de Cruza	Días de la Prueba 22-23 Días	Días de la prueba. 28 Días	DX de apoyo 45 Días.
N° 1	Pastor Belga	3 años	2-Feb-12	+	+	Radiografía
N° 2	Pomerania	4 años	18-Mar-12	-	+	Ultrasonido
N° 3	Boxer	2 años	7-Ene-12	+	+	Ultrasonido
N° 4	Pug	4 años	20-Mar-12	+	+	Ultrasonido
N° 5	Labrador	3 años	14-feb-12	-	+	Radiografía

+ Positivo a la prueba.

- Negativo a la prueba.

Días despues de la última monta.

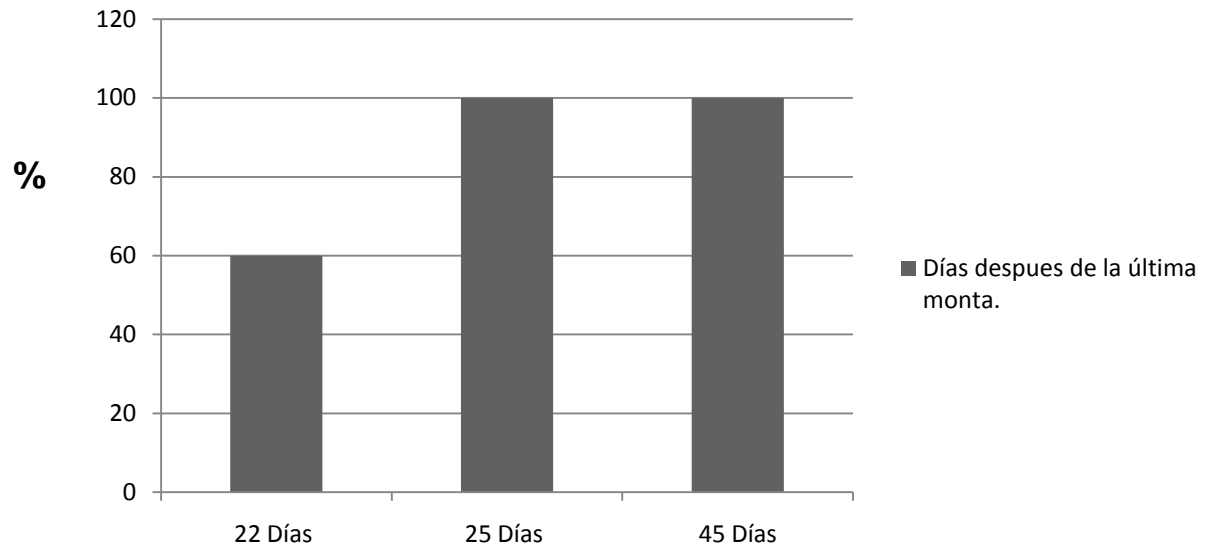


Fig. 5.1.

Resultados en porcentajes de efectividad de acuerdo a los días en que se realiza el diagnóstico de gestación por medio de un ensayo inmunoenzimático para determinar la presencia de relaxina en sangre.

- a) En el diagnóstico a 22 días se observaron 3 aciertos teniendo un porcentaje de efectividad de 60.0%.
- b) A 28 días hubo 5 aciertos con 100% de efectividad.
- c) A los 45 días un total de 5 hembras de 5 se diagnosticaron acertadamente, teniendo un porcentaje de 100% de efectividad.

Cabe mencionar que se realizó en 3 perras un diagnóstico de gestación por medio de radiografía ya que tiene un porcentaje de efectividad de 100% a 45 días de gestación. En 2 perras se confirmó el diagnóstico con ultrasonido.

6 DISCUSIÓN.

De acuerdo a los experimentos realizados anteriormente esta técnica tiene como objetivo principal determinar con la mayor brevedad posible si la hembra quedó o no gestante en su última monta. Dependiendo de los resultados, ya sea positivoo negativo se tomaran las medidas necesarias para realizar los procedimientos de rutina.

Hoy en día esta técnica nos permite la detección temprana de gestación en perras y gatas ya que es muy efectiva y 100% confiable. Considerando a la Relaxina como el mejor marcador de gestación.

7 CONCLUSIÓN.

Esta técnica de diagnóstico es lo suficientemente confiable (99%) para realizar un acertado diagnóstico de gestación. Teniendo en cuenta la facilidad para realizarla y la rapidez del resultado hacen de esta prueba una opción confiable para realizar un diagnóstico de gestación.

8 RECOMENDACIONES.

Con base a este estudio, se observó que era difícil determinar si la gestación comienza a contar en el primer día de monta de la perra o en el último, sería una buena opción el determinar el momento de la ovulación por medio de la medición de niveles de LH en sangre e identificando el momento de pico preovulatorio de LH, pudiendo de esta manera, saber el momento óptimo para realizar el apareamiento y de esta manera tener una noción más exacta de los días de gestación, por lo tanto, el momento de realizar la prueba y programar la fecha probable del parto. Se recomienda ésta prueba para ser utilizada en la clínica de pequeñas especies, ya que es confiable, rápida y segura para el paciente. Además de su gran utilidad para el diagnóstico de una seudogestación.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Bamberger A. M., Ivell R., Balvers. Relaxin-like factor (RLF): a new specific marker for leydig cells in the ovary. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 1999 Apr; 18 (2): 163-8.
2. Bjorklund K., Bergstrom S., Nordstrom M. L. Symphyseal distention in relation to serum relaxin levels and pelvic pain in pregnancy. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 2000 Abr; 79 (4): 269 –75.
3. Boockfor F.R., Fullbright G. relaxin-like factor (RFL) serum concentrations and gubernaculum RFL receptor display in relation to pre- and neonatal development of rats. *Reproduction* 2001 Dec; 122 (6): 899-906.
4. Buff S., Fontbonne A., Lopez P. Circulating relaxin concentrations in pregnant and nopregnant bitches: evaluation of a new enzymeimmunoassay for determination of pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 2001; 51: 187-91.
5. Bullesbach E.E., Rhodes R., Rembiesa B. The relaxin-like factor is a hormone. *Endocrine* 1999 Apr; 10 (2): 167-9.
6. Cancannon P.W. Biology of gonadotrophin secretion in adult anprepubertal female dogs. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 47: 3-27.
7. Concannon P.W. McCannn, Temple M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1989; 39: 3-25.
8. Cancannon P.W., Gimpel T., Newton L. Postimplatation increase in plasm fibrinogen concentration whith increase in relaxin concentration in pregnant dogs. *Am. J. Vet. Res.* 2000 Sep; 57(9): 1382-5.
9. Dschietzig T., Richter C., Bartsch C. The pregnancy hormone relaxin is a player in human heart failure. *FASEB J.* 2001 Oct; 15(12): 2187-95.

10. Einspanier A., Muller D. Characterization of relaxin binding in the uterus of marmoset monkey. *Mol. Hum. Reprod.* 2001 Oct; 7(10): 963-70.
11. Esquivel L., Páramo R. eventos endocrinos del ciclo estral de la perra y fármacos utilizados como anticonceptivos y abortivos. *AMMEPE Vol. 12, N°1, 2001^a Ene-Feb, Pág. 6-9.*
12. Esquivel L., Páramo R. Gestación en la perra, *AMMEPE Vol. 12, N°3, 2001b May-Jun. Pág.78-82.*
13. Esquivel L., Rivera R. Diagnóstico de gestación en lobo americano *Canis lupus Bailey*; a través de ultrasonido de tiempo real. Dpto de reproducción Inseminación artificial. *FMVZ-UNAM, boletín informativo, 2001, Marzo Vol.2 pp.1-6.*
14. Gerson W., Laura T., Goldsmith. Relaxin and the cervix. The endocrinology of parturition, 2001, Vol 27, pp 105-112.
15. Hombach-Klonisch S. Relaxin-like mRNA expression in the fallow deer. *Mol. Cell Endocrinol* 2000 Jan 25; 159 (1-2): 147-58.
16. Hsu S. Y., Nakabayashi K., Kumagai J. Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science* 2002 Jan 25; 295 (5555):671-4.
17. James E. Breazile. Reproductive system in the female. *Vet. Med. Sci.* 1991 Dec; 53 (3):1052.
18. Klonisch T., Hombach-Klonisch S. Canine relaxin: nucleic acid sequence and localization within the canine placenta. *Boil. Reprod* 1999 Mar; 60 (3): 551-57.
19. Klonisch T. Kaufold J., Steger K. Canine relaxin-like factors unique molecular structure and differential expression within reproductive tissues of the dog. *Boil. Reprod.* 2001 Feb; 64(2): 442-50.

20. Osman A.H. Immunolocalization of relaxin in the corpus luteum of the dromedary camel. *Kobe J. Med. Sci.* 2000 Dec; 46(6): 245-63.
21. Peters C.A. Activation of PKC delta in the rat corpus luteum during pregnancy. Potential role of prolactin signaling. *Boil. Chem.* 1999 Dec 24; 274 (52): 37499-505.
22. Plesner S.A., Kuznetsova. Adenylatecyclase signaling mechanism of the relaxin infusion. *Biokhim. Fisiol.* 2000 Nov- Dec; 36(6): 562-8.
23. Riviera R., Esquivel L. utilización de la citología vaginal exfoliativa para el seguimiento del ciclo estral del lobo gris mexicano. *Zoológico de san juan de Aragón. Departamento de reproducción e inseminación artificial, FMVZ-UNAM, Boletín informativo, 2001 Enero, Vol. 1, pp. 2-7.*
24. Root-Kustritz. Breeding management in the dog. *Reprod Anim* Vol. 23 N°2, pp 106-108, 1999.
25. Song L., Ryan P.L., Porter D.G. Effects of relaxin on matrix remodeling enzyme activity of cultured equine ovarian cells. *Anim. Reprod. Sci.* 2001a may31; 66(3-4): 239-55.
26. Song L., Ryan P.L., Porter D.G., Coomber B.L. effects of relaxin on matrix remodeling enzyme activity of cultured equine ovarian stromal cells. *Anim. Reprod. Sci.* 2001b May 31; 66 (3-4):239-5.
27. Steinetz B.G., Goldsmith L.T., Harvey H.J. Serum relaxin and progesterone concentrations in pregnant bitches: detection of relaxin as a marker of pregnancy. *Am. J. Vet. Res.* 1990a Jan; 50(1): 68-71.
28. Steinetz B.G., Goldsmith L.T., Hasan S.H. Diurnal variation of serum progesterone, but not relaxin, prolactin, or estradiol-17 beta in the pregnant bitch. *Endocrinology* 1990b Sep; 127 (3): 1057-63.
29. Steinetz B.G., Goldsmith L.T., Lust G Plasma relaxin levels in pregnant and lactating dogs. *Biol. Reprod.* 1990c Oct; 37 (3): 719-

- 25.
30. Stewart D.R., Henzel W.J., Vandlen R. Purification and sequence determination of canine relaxin. *J. Protein. Chem.* 1992 Jun; 11(3): 247-53.
31. Sunder S., Lenton E.A. Endocrinology of the peri-implantation period. *Obstet. Gynaecol.* 2000 Oct;14 (5): 789-800.
32. Sunn N., Egli M., Burazin T.C. Circulating relaxin acts on subfornical organ neurons to simulate water drinking in the rato. *Proc. Natl. Ascad. Sci. USA* 2002 Feb 5; 99(3): 1701-1706.
33. Symbiotics Corporation. Canine pregnancy test kit (ReproCHEK). For the detection of the canine hormone relaxin. 2001.
34. Tsutsui T. gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *Reprod. Fert. Suppl.* 1989: 39: 269-275.
35. Tsutsui T., Stewart Dr. Determinación de la fuente de relaxina por inmunoreactividad durante la gestación de la perra. *J. Vet. Med. Sci.* 1991 Dec; 53 (6): 1025-9.
36. Zarco L. Implantacion y placentación. *Histología Veterinaria Aplicada*, segunda edición, Ed. Med, 1993 Pág. 115-119.