

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA GESTACIONAL
POR UN ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO A 22, 25
Y 28 DÍAS, DESPUÉS DE LA ÚLTIMA MONTA EN
PERRAS**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

ARMANDO ERIK JARQUIN IGNACIO

ASESOR:

MVZ JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS

TORREÓN, COAHUILA

JUNIO 2002

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA GESTACIONAL
POR UN ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO A 22, 25
Y 28 DÍAS, DESPUÉS DE LA ULTIMA MONTA EN
PERRAS**

TESIS

APROBADO POR EL COMITÉ DE TESIS

PRESIDENTE DEL JURADO




MVZ JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELIAS

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL**



MVZ ERNESTO MARTINEZ ARANDA


Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal
UAAAN - UL

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA GESTACIONAL
POR UN ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO A 22, 25
Y 28 DÍAS, DESPUÉS DE LA ÚLTIMA MONTA EN
PERRAS**




MVZ. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS
PRESIDENTE



MVZ. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ
VOCAL



MVZ. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA
VOCAL



DR. GERARDO DUARTE MORENO
VOCAL SUPLENTE

AGRADECIMIENTOS

A mi “ALMA MATER” por heredarme una profesión, teniendo un compromiso durante toda la vida, el cual es representarla con orgullo.

A todos mis profesores que compartieron conmigo sus conocimientos.

En especial a aquellos, con los cuales compartimos el mismo ideal el cual defendimos en todo momento. “Muchas gracias”

Agradezco a mis asesores por su tiempo y su dedicación en la realización de este trabajo:

MVZ. José Luis Francisco Sandoval Elías

Dr. Gerardo Duarte Moreno

MVZ. Ernesto Martínez Aranda.

Y en especial a un amigo el cual sirvió de pilar para la realización de este trabajo. Gracias y ojalá nunca pierdas esa disposición para emprender nuevos proyectos, MVZ. Carlos Raúl Rascon Díaz

A todos mis compañeros...gracias.

AGRADECIMIENTOS

A MI FAMILIA

A una persona que sin tener conocimientos de ciencias relacionadas a la veterinaria, me enseñó a comprender que la nobleza y belleza de los animales es mas grande que la del ser humano.

A mi abuelo Prof. Indalecio Jarquin

Agradezco con toda mi admiración a mis Padres por darme el don de la vida Gracias los quiero.

Abdón y Silvia

A mis hermanos para que sigan un ejemplo, de que en esta vida sin importar la dificultades todo se puede.

David

Carlos

Sheila

A mis Tíos, por sus consejos y por estar conmigo cuando mas los necesito..

Elda

Héctor y Adelina

Beatriz

Zoila y Moisés

Irma

A mis primos con todo mi cariño por estar conmigo .

Javier

Alejandro

Daniel

Italivi

Alejandra

Laura

Karla

Jassiel

Al Prof. Alfonso Muñoz Morales y a la Prof. Ana Maria Ríos Lacunza, Por su comprensión y su apoyo incondicional.

Gracias.

DEDICATORIAS

A Dios por darme la oportunidad de vivir y darme fortaleza en los momentos mas difíciles de mi carrera.

A una persona que me enseñó a vivir, que me hizo un hombre de bien, que sacrifico todo por mi y por haberme regalado lo mas hermoso de la vida, me enseñó a Amar.

A mi Mama Ricarda

Gracias

Por ser lo mas preciado en mi vida, darme fuerzas en los momentos mas difíciles y por compartir la vida conmigo.

A mi esposa Ana Lilia

Te amo.

A un regalo de Dios, que me ha enseñado cosas nuevas y que cada día aprendo mas de ti con todo mi amor.

A mi hija Hanna Valeria.

INDICE.

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Métodos de Diagnóstico	3
2.1.1 Palpación abdominal.	3
2.1.2 Radiografía.	3
2.1.3 Ultrasonido.....	3
2.1.4 Niveles de fibrinogeno en sangre.....	4
2.1.5 Niveles de relaxina en sangre.....	4
1.2 Justificación	5
1.2 Objetivo	5
1.1 Hipótesis	5
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. Introducción	6
3.2. Eventos Reproductivos del Ciclo Estral.	8
3.2.1. Etapas del ciclo	8
3.2.2. Pico preovulatorio de LH.	9
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.	13
3.2.8 . Hormona relaxina.....	14
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.	17
4.1. Material	17
4.2. Animales	17

4.3.Descripción del Ensayo Inmunoenzimatico (Test ReproCHEK).....	17
4.4.Métodos.....	17
4.5.Prueba de diagnostico ReproCHEK.....	18
V. RESULTADOS.....	20
VI. CONCLUSIONES.....	23
VII. RECOMENDACIONES.	23
VIII. BIBLIOGRAFÍA	24

INDICE DE FIGURAS

Fig. 3.1.....	7
Fig. 3.2.....	16
Fig. 5.1.....	21

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 éste por medio de comparaciones a 22, 25 y 28 días de gestación.

Se utilizaron 15 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 2001 a febrero de 2002. A cada hembra se le tomaron muestras sanguíneas de la vena cefálica a los 22, 25 y 28 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 efectividad a los 22, 25 y 28 días de gestación. Teniendo un porcentaje de eficacia a los 22 días de 53.3%, a los 25 días de 66.6% y a los 28 días un porcentaje de 93.3% de efectividad.

El diagnóstico se corroboró con una prueba radiográfica a los 42 días de gestación o en su caso con el parto.

II. INTRODUCCION

El diagnóstico de gestación en las especies domésticas 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. En 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 podrán aplicar los tratamientos pertinentes, lo que no puede hacerse cuando una perra está gestante ya que algunos de los fármacos producen alteraciones teratogénicas (Rivera y Esquivel, 2001).

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

2.1 Métodos para el Diagnóstico de Gestación en la Perra.

2.1.1 Palpación abdominal.

Se puede realizar a partir de los 25 días de gestación pero su principal desventaja es que el operador requiere de 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 diagnóstico 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 perra doméstica, 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 fibrinogeno en sangre.

Otra de las técnicas utilizadas en la Medicina Veterinaria para el diagnóstico de gestación en perras es la determinación de niveles de fibrinogeno en sangre, ya que los niveles de fibrinogeno aumentan después de la implantación por la producción elevada en 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 ultima 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 éste nuevo ensayo inmunoenzimático para el diagnóstico de gestación.

2.3 Objetivo.

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

Se evaluará el ensayo inmunoenzimático a 22, 25 y 28 días después de la última monta.

2.4 Hipótesis.

La presencia de relaxina en sangre deberá detectarse a partir del día 22 de gestación después de la última monta, utilizando la técnica de ensayo inmunoenzimático. 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 sangre se comenzó a utilizar en el año 2001. El kit de pruebas 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 (8 ng/ml) indica gestación (Buff *et al.*, 2001).

Buff *et al.* (2001) demuestran que esta forma de diagnóstico es altamente confiable en la determinación de éxitos 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 un 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).

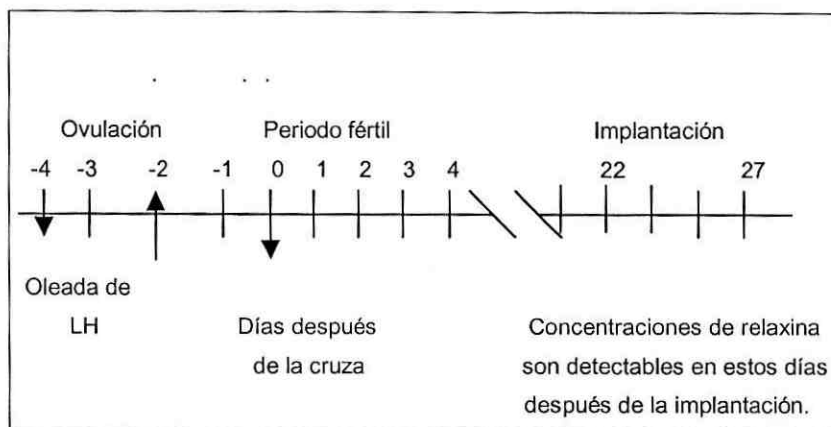


Fig.3.1.

Figura 3.1. El día de la última monta es indicado 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 cruzas debido a que las células espermáticas sobreviven por un periodo 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; Sunn *et 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 monoéstrico 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 del 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 la 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 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 lútea 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 primer 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 óvulo sea maduro (ovocito secundario) situación que en la perra no es inmediata, ya que esta especie, óvula en estadio de ovocito primario y aproximadamente 108 horas después, alcanza su segunda división meiótica para convertirse en un ovocito secundario. Este es un buen argumento para decidir que la perra deberá de aparearse más de una vez (Tsutsui, 1989).

Los embriones permanecen en el oviducto de seis a 12 días, tiempo en el que alcanzan el estadio de 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 óvulo 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 2 mm 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 la 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 endoplásmico 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 endoplásmico 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 $\text{PGF2}\alpha$ (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 la secreción de progesterona y la destrucción del cuerpo lúteo; desafortunadamente, en el caso 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 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 quedó gestante, entonces el cuerpo lúteo se destruye, los niveles séricos de progesterona disminuyen, se produce una retroalimentación negativa hacia el hipotálamo que lo 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 quedo gestante y hasta 100 días si quedo 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 sólo 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 ocupará 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, pasarán 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 sólo 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 progestacional 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 (Song *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 (20 pg/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 (Hsu *et 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 hormona adrenocorticotrópica (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 ha 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 con un péptido de 25 aminoácidos, un dominio B de 35 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 diagnostico 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; Bullesbach *et al.*, 1999, Plesnera y Kuznetsova, 2000).

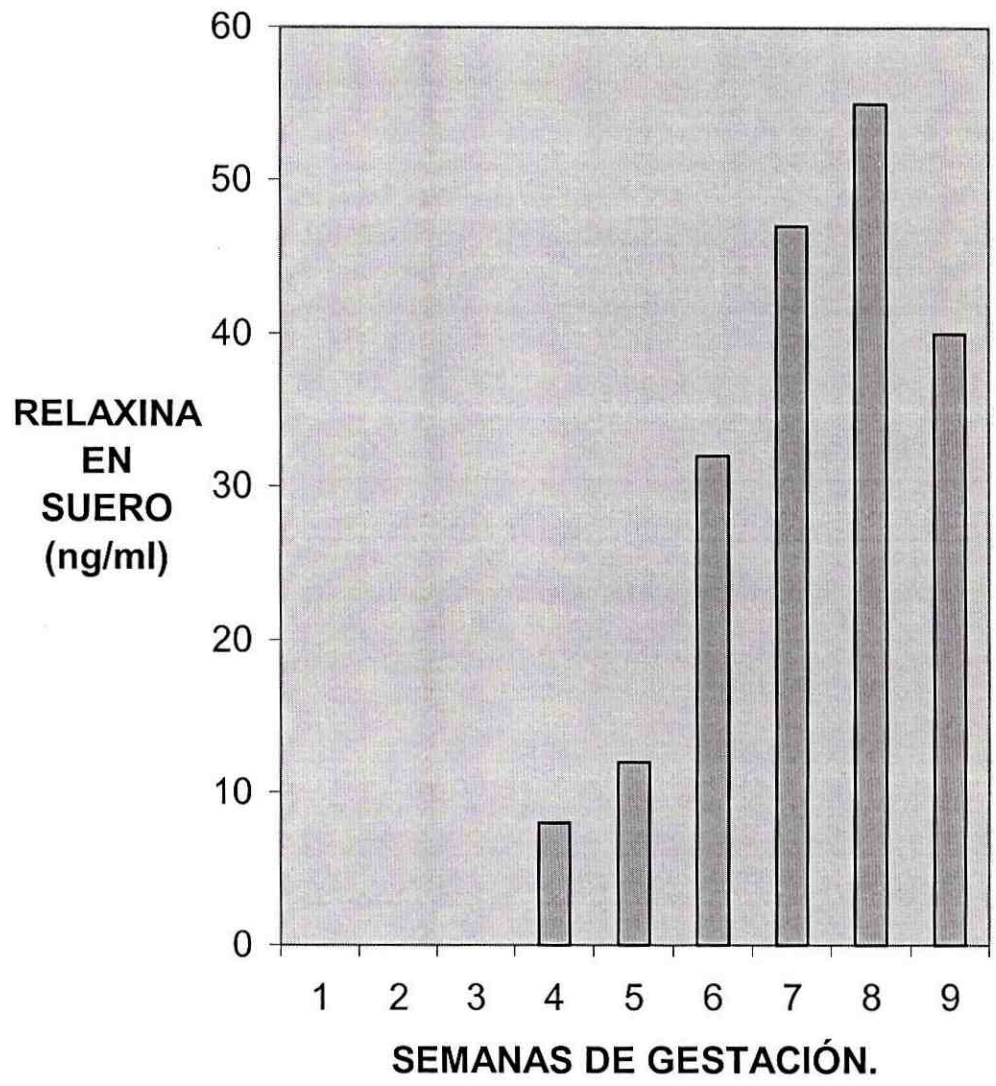


Fig. 3.2. Niveles de relaxina durante la gestación de la perra (Steinetz, 1989).

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Material.

- 1) 45 tubos de ensaye con tapa.
- 2) Un frasco de heparina con 5 ml con 5000 UI/ml.
- 3) 45 jeringas de 3 ml con agujas del N.22
- 4) 2 litros de agua destilada.
- 5) Alcohol.
- 6) Cronometro.
- 7) Rollo de toallas de papel.

4.2 Animales.

Se utilizaron 15 hembras caninas de diferentes razas, diferentes edades, que hubieran tenido una gestación y un parto anterior a estudio.

4.3 Ensayo inmunoenzimático (Test Reprochek)

- a) 60 celdillas que contienen anticuerpos policlonales antirelaxina.
- b) Recipiente A contiene anticuerpos altamente específicos a la relaxina.
- c) Recipiente B contiene enzima peroxidasa.
- d) Recipiente C Control negativo.
- e) Recipiente D control positivo.
- f) Recipiente F contiene un sustrato cromogénico.
- g) Recipiente de agua bidestilada.

4.4 Métodos.

Se llevo un control de las 15 perras, las cuales como requisito para realizar el estudio, era que hubieran 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) ¿Cuántas veces se ha servido?
- 9) Fecha del celo anterior.
- 10) ¿Se apareo?
- 11) Cuando comenzó este celo.
- 12) ¿Se apareo por primera vez?
- 13) ¿La ultima monta?
- 14) Fecha para la primera prueba (22 días).
- 15) Fecha para la segunda prueba (25 días).
- 16) Fecha para la tercera prueba (28 días).
- 17) Fecha para diagnóstico con radiografía.
- 18) Fecha del parto.
- 19) Firma del asesor.

Se les tomaron muestras a todas las perras a los 22, 25 y 28 días después de la ultima monta.

A los tubos de ensaye se les adicionó .2ml de heparina 1000 UI como anticoagulante recomendado para esta prueba. Se obtuvo 1ml de sangre por muestra de la vena cefálica.

Estas muestras fueron transportadas en hieleras con refrigerantes de gel, al laboratorio.

4.5 Descripción de la Técnica del Ensayo inmunoenzimatico (Test ReproCHEK).

- 1) Se calcularon el número de celdas requeridas para las muestras, con dos más para el control.
- 2) Se les adicionó a las celdas destinadas para las muestras una gota del recipiente A (anticuerpos altamente específicos a la relaxina) y una gota del recipiente B (enzima peroxidasa).

- 3) A las celdas destinadas al control negativo se les adicionó una gota del recipiente C (control negativo) y una gota del recipiente D (control positivo) al control positivo.
- 4) A continuación a las celdas para la muestras se les adicionó 2 gotas de sangre.
- 5) Se tomo el tiempo de 10 minutos para la incubación.
- 6) Pasado este tiempo de 10 minutos se dio un lavado vigoroso con el agua bidestilada, asegurando de no dejar residuos de sangre.
- 7) Después del lavado se le adicionó tres gotas del recipiente F (sustrato cromogénico) por celda , posteriormente se tomó un tiempo de 5 minutos para realizar la lectura
- 8) La interpretación de los resultados es la siguiente:
 - a) Control negativo: Da como resultado un color claro o un azul bajo.
 - b) Control positivo: Da un azul intenso.
 - c) Muestras positivas: Da un azul bastante intenso.
 - d) Muestra negativa: Da un azul claro o una celda sin color.

Este diagnóstico se corroboró con un diagnóstico de gestación por medio de radiografía a los 42 días después de la ultima monta o en su caso hasta el parto.

V. RESULTADOS.

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

# de Perra	22 días	25 días	28 días	Dx de apoyo
No 1	+	+	+	Parto
No 2	-	+	+	Parto
No 3	-	+	+	Radiografía +
No 4	+	+	+	Parto
No 5	+	+	+	Parto
No 6	-	-	-	Radiografía +
No 7	+	+	+	Radiografía +
No 8	-	-	-	No hubo gestación
No 9	-	-	-	No hubo gestación
No 10	-	-	-	No hubo gestación
No 11	-	+	+	Parto
No 12	-	-	+	Radiografía +
No 13	-	-	+	Ovariohisterectomia+
No 14	-	-	+	Radiografía +
No 15	-	-	+	Radiografía +

+ Positivo a la prueba.

- Negativo a la prueba.

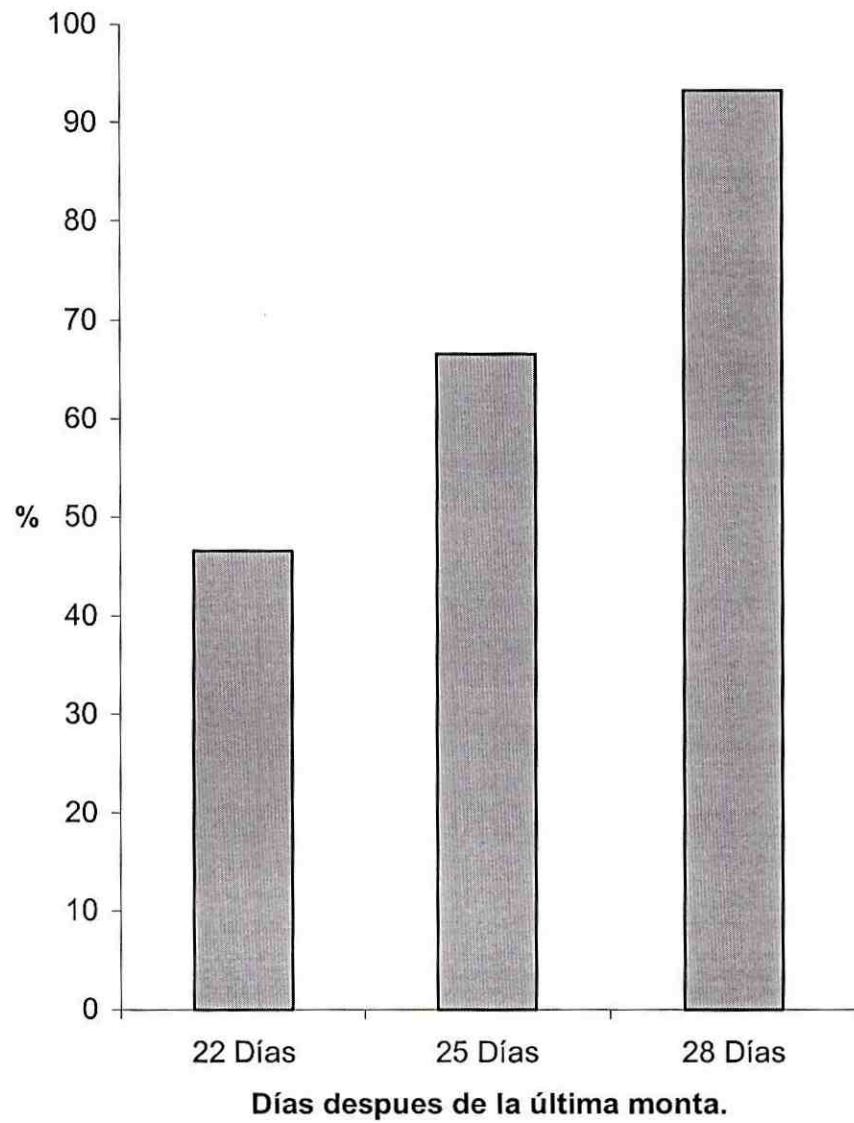


Fig. 5.1.

Resultados en porcentaje 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 7 aciertos teniendo un porcentaje de efectividad de 46.6%.

b) A 25 días hubo 10 aciertos con 66.6% de efectividad.

c) A los 28 días un total de 14 hembras de 15 se diagnosticaron acertadamente, teniendo un porcentaje de 93.3% de efectividad.

Cabe mencionar que se realizó en 6 perras un diagnóstico de gestación por medio de radiografía ya que tiene un porcentaje de efectividad de 100% a 45 días de gestación. En 5 perras se confirmó el diagnóstico con el parto, en 3 perras no hubo gestación y en una perra el diagnóstico se confirmó al realizarle ovariectomía encontrándose ésta en etapa de gestación.

En la perra numero 6 hubo un resultado negativo de las tres pruebas, en el diagnóstico por placa radiográfica dio positivo a gestación y pariendo un solo cachorro.

VI. CONCLUSIONES.

Esta técnica de diagnóstico es lo suficientemente confiable 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.

El porcentaje mayor de efectividad se logró entre los días 25 y 28 después de la última monta, siendo estos días un punto de referencia para realizar la prueba.

VII. 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.

VIII. BIBLIOGRAFIA

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 Apr; 79(4): 269-75.
3. Boockfor F.R., Fullbright G. Relaxin-like factor (RLF) serum concentrations and gubernaculum RLF 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. Concannon P.W. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 47: 3-27.
7. Concannon P.W. McCann, Temple M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1989;39:3-25.
8. Concannon P.W., Gimpel T., Newton L. Postimplantation increase in plasma 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, No1, 2001a Ene-Feb, Pág. 6-9.
12. Esquivel L., Páramo R. Gestación en la perra. AMMEPE Vol.12, No3,2001b May-Jun. Pág.78-82.
13. Esquivel L., Rivera R. Diagnostico de gestación en lobo americano *Canis lupus bailey*; a través de ultrasonido de tiempo real. Depto 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. Biol. Reprod 1999 Mar;60(3):551-57.
19. Klonish T., Kauuffold J., Steger K. Canine relaxin- like factors unique molecular structure and differential expression whithin reproductive tissues of the dog. Biol. 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 durin pregnancy. Potential role of prolactin signaling. Biol. Chem. 1999 Dec 24;274(52): 37499- 505.

22. Plesner S.A., Kuznetsova. Adenylate cyclase signaling mechanism of the relaxin function. *Biokhim. Fisiól.* 2000 Nov-Dec; 36 (6): 562-8.
23. Rivera 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 No.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 May 31; 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 rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002 Feb 5; 99(3): 1701-1706.

33. Synbiotics 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 inmumoreactividad durante la gestación de la perra. *J. Vet. Med. Sci.* 1991 Dec; 53(6): 1025-9.
36. Zarco L. Implantación y placentación. *Histología Veterinaria Aplicada*, Segunda edición, Ed. Med, 1993 Pág. 115-119.